
**Entwicklung eines
durchflusszytometrischen Verfahrens zur
Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und
Thrombozytenzahl sowie zur
Leukozytendifferenzierung beim Huhn**

Christian Seliger



München 2009

Aus dem Lehrstuhl für Tierphysiologie
(Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger)
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

**Entwicklung eines durchflusszytometrischen
Verfahrens zur Bestimmung der
Gesamtleukozytenzahl und Thrombozytenzahl sowie
zur Leukozytendifferenzierung beim Huhn**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Christian Seliger

aus
München

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Kaspers
Korreferenten:	Univ.-Prof. Dr. Hirschberger Univ.-Prof. Dr. Zerbe Univ.-Prof. Dr. Hermanns Univ.-Prof. Dr. Gerhards
Tag der Promotion:	6. Februar 2009

Meinen Eltern

„Blut ist ein ganz besondrer Saft“

Faust, Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	1
3 Literatur	2
3.1 Die Blutzellen der Vögel	2
3.1.1 Erythrozyten	4
3.1.2 Thrombozyten	4
3.1.3 Leukozyten	5
3.1.3.1 Lymphozyten	5
3.1.3.2 Monozyten	6
3.1.3.3 Heterophile Granulozyten	6
3.1.3.4 Eosinophile Granulozyten	7
3.1.3.5 Basophile Granulozyten	8
3.2 Blutentnahme	8
3.3 Antikoagulanzen	9
3.4 Blutausstriche	11
3.5 Das weiße Blutbild	13
3.5.1 Interpretation des Leukogramms beim Vogel	13
3.5.2 Das automatisierte weiße Blutbild	16
3.5.3 Versuche zur automatisierten Blutbilderstellung beim Vogel	17
3.6 Mikroskopische Verfahren zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl beim Vogel	20
3.6.1 Direkte Verfahren	21
3.6.1.1 Phloxin B-Färbung	21
3.6.1.2 Verfahren nach Natt und Herrick	23
3.6.1.3 Toluidin Blau-Verfahren	24
3.6.2 Indirekte Verfahren	25
3.6.2.1 Schätzung der Gesamtleukozytenzahl anhand des Blutausstrichs	25
3.7 Erstellung des Differentialblutbildes beim Vogel	29
3.8 Die Variabilität des Weißen Blutbildes	30

Inhaltsverzeichnis

3.9 Durchflusszytometrie	31
4 Material und Methoden	34
4.1 Tiere und Tierhaltung.....	34
4.2 Gewinnung von heparinisiertem Blut	34
4.3 Gewinnung von EDTA-Blut.....	34
4.3.1 Monovetten	34
4.3.2 Vacutainer.....	34
4.4 Gewinnung von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) von Hühnern...	35
4.4.1 Material	35
4.4.2 Durchführung	36
4.4.2.1 Diskontinuierliche Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation	36
4.4.2.2 Slow Speed Zentrifugation.....	36
4.4.2.3 Zellzählung in der Modifizierten Zählkammer nach Neubauer	37
4.5 Blutausstriche	37
4.5.1 Material	37
4.5.2 Anfertigung	37
4.5.3 Färbungen	38
4.5.3.1 Wright-Giemsa Färbung.....	38
4.5.3.1.1 Material	38
4.5.3.1.2 Durchführung	39
4.5.3.2 Diff Quik Schnelfärbung	39
4.5.4 Mikroskopische Untersuchung.....	39
4.5.4.1 Differentialblutbild	39
4.5.4.2 Schätzung absoluter Leukozyten- und Thrombozytenzahlen	40
4.5.4.2.1 Verfahren nach Campbell modifiziert nach Pendl	40
4.6 Durchflusszytometrie	41
4.6.1 Durchflusszytometer	41
4.6.2 Antikörper	42
4.6.2.1 Direktkonjugate	42
4.6.2.2 Primäre Antikörper.....	43
4.6.2.3 Sekundäre Antikörper	43
4.6.2.4 Konjugationen.....	43
4.6.2.5 FITC-Konjugation.....	43
4.6.2.5.1 Material	43

Inhaltsverzeichnis

4.6.2.6 Aufkonzentrierungen.....	44
4.6.2.6.1 Durchführung.....	44
4.6.2.6.2 RPE-Konjugation	45
4.6.2.6.3 PerCP-Konjugation	45
4.6.2.7 Aufreinigung der Konjugate	46
4.6.3 Färbungen	46
4.6.3.1 Periphere Blutleukozyten.....	46
4.6.3.2 Vollblut.....	46
4.6.3.2.1 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC ₅ (3))-Färbung	46
4.6.3.2.1.1 Material	46
4.6.3.2.1.2 Durchführung.....	46
4.6.3.2.2 Kombination von 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC ₅ (3)) mit monoklonalen Antikörpern	46
4.6.3.3 Durchflusszytometrische PBMC-Färbung mittels monoklonaler Antikörper	47
4.6.3.3.1 Material.....	47
4.6.3.3.2 Einfachfärbung von PBMC.....	47
4.6.3.3.3 Doppelfärbung	48
4.6.4 Fixierung.....	48
4.6.5 Entwicklung der Single-Tube No-Wash-Färbung von Blut.....	48
4.6.5.1 α -Huhn-Direktkonjugat mit Waschschrift.....	48
4.6.5.2 α -Huhn-Direktkonjugat ohne Waschschrift	49
4.6.5.3 primärer mAK + sekundäres Ziege- α -Maus-IgG-Fluorochrom-Konjugat mit Waschschriften	49
4.6.5.4 primärer mAK + sekundäres Ziege- α -Maus-IgG-Fluorochrom-Konjugat ohne Waschschriften	49
4.6.6 Entwicklung der Multi-Colour-Single Tube-No-Wash-Färbung von Blut .	49
4.6.7 Single-Tube No-Wash-Färbung fixierter Blutproben mit absoluter Quantifizierung von Thrombozyten und Leukozyten.....	50
4.6.7.1 Grundsätzliche Hinweise	50
4.6.7.2 Fixierung der Blutproben mit Transfix	51
4.6.7.3 Färbung im Single-Tube No-Wash-Verfahren.....	51
4.6.7.3.1 Vorbereitungen für die Färbung	51
4.6.7.3.2 Material.....	51

Inhaltsverzeichnis

4.6.7.3.2.1	Fluopuffer	51
4.6.7.3.2.2	Antikörper-Lösungen	51
4.6.7.3.2.3	TruCOUNT Tubes	52
4.6.7.3.3	Berechnung und Herstellung der mAK-Stammlösungen.....	52
4.6.7.3.4	Verdünnung der Blutprobe.....	52
4.6.7.3.5	Durchführung der Färbung.....	53
4.6.7.3.6	Verzicht auf Isotypenkontrollen.....	53
4.7	Messung von Hühnerblutproben am FACScan/FACScalibur	53
4.7.1	Geräteeinstellungen.....	53
4.7.2	Erstellung eines Messblattes	54
4.7.3	Besonderheiten bei der Messung	55
4.7.3.1	Absolute Quantifizierung der Leukozyten	55
4.7.3.2	Verarbeitung der generierten Daten	56
4.7.4	Beads	56
4.8	Statistische Auswertung	56
5	Ergebnisse.....	57
5.1	Membranfärbung mit 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC ₅ (3)).....	57
5.1.1	Huhn	57
5.1.2	Exoten	59
5.1.3	Greifvögel	60
5.2	Färbung von Vollblut.....	61
5.2.1	No-Lyse-Färbung von Vollblut	62
5.3	Kombination von 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC ₅ (3)) mit mAKs..	66
5.4	Panleukozytenfärbung	68
5.5	Thrombozytenfärbung.....	69
5.6	Kombination von Panleukozytenfärbung und Thrombozytenfärbung mit den Antikörpern anti-CD45-FITC und anti-CD41/61RPE.....	70
5.7	Monozytendarstellung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers K1	71
5.7.1	Versuch der Monozytendarstellung in PBMC-Suspensionen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers K1	71
5.7.2	Versuch der Monozytendarstellung im Vollblut mit Hilfe K1-RPE-Direktkonjugates.....	72
5.8	Aufreinigung K1	72

Inhaltsverzeichnis

5.9 Kombination von Panleukozytenfärbung und Thrombozytenfärbung mit den Antikörpern anti-CD45-FITC und K1-RPE	73
5.10 Aufreinigung α CD45-PerCP	74
5.11 Vergleich der Konjugate α CD45-FITC und α CD45-PerCP	75
5.12 Kombination von Panleukozytenfärbung und Thrombozytenfärbung mittels K1-RPE/ α CD45-PerCP	75
5.13 Färbungen zur Darstellung von Leukozytensubpopulationen	76
5.13.1 Monozytenfärbung mit KUL01	76
5.13.2 B-Zell-Marker	77
5.13.2.1 L-Kette	77
5.13.2.2 BU1	78
5.13.3 T-Zell-Marker	79
5.13.4 T-Lymphozytenfärbung mit α CD3-FITC	79
5.13.4.1 T-Lymphozytenfärbung mit α CD4-FITC	80
5.13.4.2 T-Lymphozytenfärbung mit α CD8	80
5.13.4.2.1 α CD8 α (3-298)	80
5.13.4.2.2 α CD8 α (CT8)	81
5.13.4.3 Mehrfachfärbung mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8aFITC, BU1-FITC	81
Charakterisierung der CD45-PerCP ⁺ , K1-RPE ⁻ , KUL01-RPE ⁻ , CD4 ⁻ , CD8a, BU1 ⁻ Population	84
5.13.4.4 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten	85
5.13.4.5 Mehrfachfärbung mit α CD45-PerCP, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC	88
5.13.4.6 Lymphozytenmarker α CD5	89
5.13.4.7 Mehrfachfärbung mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC	91
5.13.4.8 α CD45SPRD	96
5.14 Absolute Quantifizierung	97
5.14.1 Fluospheres polystyrene microspheres	97
5.14.2 CALTAG Counting Beads	98
5.14.3 Flow-Count Fluospheres	99
5.14.4 TruCOUNT beads	100
5.15 Messdauer	101

Inhaltsverzeichnis

5.16 Einfluss der Fixierung auf die „Gating“-Strategie	102
5.16.1 „Gating“-Strategie für unfixierte Proben (Tag 0)	104
5.16.2 „Gating“-Strategie für frisch fixierte Fixierte Proben (Tag 0).....	105
5.16.3 „Gating“-Strategie für fixierte Fixierte Proben (Tag 3)	106
5.17 Überprüfung der Präzision des Verfahrens.....	107
5.17.1 Präzision der mikroskopischen Leukozytenschätzung	107
5.17.2 Präzision der durchflusszytometrischen Leukozytenzählung	109
5.17.3 Vergleich der Präzision von Durchflusszytometrie und Mikroskopie .	111
5.18 Übereinstimmungsgrad zwischen Mikroskopie und Durchflusszytometrie / innerhalb der Durchflusszytometrischen Verfahren (unfixiert/ fixiert Tag 0/ fixiert Tag 3)	112
6 Diskussion	118
6.1 Überlegungen zur Statistik hämatologischer Zählverfahren	121
6.2 Beurteilung der im Methodenvergleich nachgewiesenen signifikanten Unterschiede	128
6.3 Beurteilung der Zuverlässigkeit der durchflusszytometrischen Technik.....	129
6.3.1 Genauigkeit.....	129
6.3.2 Präzision.....	132
6.4 Optionen zur Weiterentwicklung des Verfahrens.....	135
6.4.1 Reduktion der Komplexität des Verfahrens	135
6.4.1.1 Modifikation der Färbung durch Einsatz anderer Fluorochrome	135
6.4.1.2 Modifikation der Färbung durch Einsatz anderer monoklonaler Antikörper	135
6.4.2 Modifikation der Färbung durch Änderung der Fluorochrom-Antikörper- Kombinationen.....	136
6.4.3 Weitere Optionen zur Modifizierung der Färbung	137
6.4.4 Erweiterung der Leukozytendifferenzierung durch Identifizierung weiterer Subpopulationen.....	138
6.4.5 Durchflusszytometrischer Nachweis des Aktivierungszustandes von Blutzellen	139
6.4.6 Erhöhung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens	139
6.4.7 Untersuchung von Blut anderer Vogelspezies	141
6.5 Anwendungsmöglichkeiten des neu entwickelten Verfahrens	143

Inhaltsverzeichnis

6.5.1 Bestimmung von Referenzbereichen, Untersuchung von Modellen für hämatologische Veränderungen.....	144
6.5.2 Beurteilung von Belastungssituationen und Stress mit Hilfe der Bestimmung des Heterophilen/Lymphozyten-Verhältnisses.....	144
6.5.3 Beurteilung einer Immunsuppression	145
6.5.4 Gesundheitsmonitoring in Geflügelherden.....	145
6.6 Validierung und Qualitätssicherung des Verfahrens.....	146
6.7 Erhöhung der EDTA-Konzentration bei der Ungerinnbarmachung von Blut legereifer Hennen	147
6.8 Basophile und eosinophile Granulozyten.....	148
6.9 Ausblick	149
7 Zusammenfassung	151
8 Summary	153
9 Literaturverzeichnis	155
10 Anhang	179

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:.....	3
Abb. 2:.....	3
Abb. 3:.....	54
Abb. 4:.....	58
Abb. 5:.....	59
Abb. 6:.....	60
Abb. 7:.....	63
Abb. 8:.....	64
Abb. 9:.....	67
Abb. 10:.....	69
Abb. 11:.....	70
Abb. 12:.....	71
Abb. 13:.....	72
Abb. 14:.....	73
Abb. 15:.....	74
Abb. 16:.....	75
Abb. 17:.....	76
Abb. 18:.....	77
Abb. 19:.....	79
Abb. 20:.....	80
Abb. 21:.....	81
Abb. 22:.....	82
Abb. 23:.....	84
Abb. 24:.....	85
Abb. 25:.....	87
Abb. 26:.....	88
Abb. 27:.....	89
Abb. 28:.....	91
Abb. 29:.....	93
Abb. 30:.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 31:	96
Abb. 32:	97
Abb. 33:	99
Abb. 34:	100
Abb. 35:	101
Abb. 36:	102
Abb. 37:	104
Abb. 38:	106
Abb. 39:	108
Abb. 40:	109
Abb. 41:	110
Abb. 42:	111
Abb. 43:	112
Abb. 44:	114
Abb. 45:	114
Abb. 46:	115
Abb. 47:	115
Abb. 48:	116
Abb. 49:	116
Abb. 50:	117
Abb. 51:	117
Abb. 52:	120
Abb. 53:	186
Abb. 54:	188
Abb. 55:	190
Abb. 56:	192
Abb. 57:	194
Abb. 58:	196
Abb. 59:	197
Abb. 60:	198

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	42
Tab. 2:	43
Tab. 3:	87
Tab. 4:	93
Tab. 5:	108
Tab. 6:	110
Tab. 7:	123
Tab. 8:	124
Tab. 9:	125
Tab. 10:	126
Tab. 11:	127
Tab. 12:	128
Tab. 13:	180
Tab. 14:	181
Tab. 15:	182
Tab. 16:	183
Tab. 17:	184
Tab. 18:	200

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACScan	Fluorescence Activated Cell Scanner
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1-H	Fluorescence Channel 1 Height
FL2-H	Fluorescence Channel 2 Height
FL3-H	Fluorescence Channel 3 Height
FSC-H	Forward Scatter Height
G	Gauche
Hkt	Hämatokrit
LSL	Lohmann Selected Leghorn
mAK	Monoklonaler Antikörper
MFI	Mean Fluorescence Intensity
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Solution
PerCP	Peridin-chlorophyll-protein complex
PI	Propidiumjodid
RPE	Red Algae Phycoerythrin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SSC-H	Forward Scatter Height
SOPs	Standard Operating Procedures

1 Einleitung

Die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und die Erstellung des Differentialblutbildes gehören zu den am häufigsten durchgeführten, labordiagnostischen Untersuchungsverfahren in der Human- und Säugetiermedizin.

Diese beiden Untersuchungen helfen dem Kliniker dabei, sich ein Bild („Weißes Blutbild“) vom Gesundheitsstatus eines Individuums zu machen. Sie geben Einblick in den aktuellen Zustand des Immunsystems eines Patienten. Veränderungen des weißen Blutbildes sind beispielsweise oft einer der ersten Hinweise auf das Vorliegen von lebensbedrohlichen Infektionen und haben im klinischen Alltag mitunter unmittelbar therapeutische Konsequenzen, z.B. in Form einer antibiotischen Behandlung.

Mittlerweile haben weitgehend automatisierte Verfahren zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und zur Erstellung des Differentialblutbildes, die ursprünglich für die Humanmedizin entwickelt wurden, auch Einzug in die Säugetiermedizin gehalten. Dort hat der Einsatz von Hämatologie-Analyse-Geräten zu einer wesentlichen Verringerung des Arbeitsaufwandes und zu teilweise erheblich zuverlässigeren Ergebnissen gegenüber den althergebrachten mikroskopischen Verfahren geführt.

Keines der automatisierten Verfahren ist aber hinreichend zur Untersuchung von Vogelblut geeignet. Die Gründe dafür liegen im besonderen Aufbau der Blutzellen der Vögel. Bei der Leukozytenzählung in Hämatologie-Analyse-Geräten werden die störenden Erythrozyten üblicherweise durch Zugabe von Ammoniumchlorid oder hypotonen Lösungen lysiert. Die Erythrozyten der Vögel sind jedoch kernhaltig, lassen sich kaum lysieren und können bei der Messung nicht zuverlässig von Leukozyten unterschieden werden. Zudem handelt es sich bei den Thrombozyten der Vögel, anders als bei den Blutplättchen der Säuger, um lymphozytengroße, kernhaltige Zellen, die die Hämatologie-Analyse-Geräte ebenfalls nicht zuverlässig von Leukozyten differenzieren können.

So wird in der Vogelmedizin bisher weitgehend auf arbeitsaufwändige und unzuverlässige mikroskopische Verfahren zurückgegriffen oder ganz auf diese wichtigen hämatologischen Untersuchungen verzichtet.

In der zellbiologischen Forschung und der humanmedizinischen Labordiagnostik hat sich mit der Durchflusszytometrie eine äußerst leistungsfähige Technik zur Differenzierung und Zählung verschiedenster in Suspension vorliegender Zellen

Einleitung

etabliert. Entsprechend stellt sich die Frage, ob mit Hilfe dieser Technologie die Lücke „automatisierte Erstellung des weißen Blutbildes in der Vogelmedizin“ geschlossen werden kann.

2 Zielsetzung

Viele durchflusszytometrischen Anwendungen beruhen auf dem Einsatz von speziesspezifischen monoklonalen Antikörpern, die oftmals nur die Identifizierung von Zellen einer Tierart ermöglichen. Ein auf der Durchflusszytometrie basierendes Verfahren wäre also möglicherweise nur für die Untersuchung von Blut einer einzigen Vogelspezies geeignet. So wurde aus zwei Gründen in der vorliegenden Arbeit das Huhn als Modell für alle anderen Vogelspezies gewählt. Zum einen waren aufgrund der am Huhn durchgeführten immunologischen Forschungsarbeiten in den letzten Jahrzehnten bereits viele für die Durchflusszytometrie nutzbare Marker und Methoden entwickelt worden. Zum anderen hat das Huhn als wichtiger Lieferant von Fleisch und Eiern größte Bedeutung für die Ernährung der Menschheit.

Um also durch die zu leistende Entwicklungsarbeit einen größtmöglichen Nutzen für Mensch und Tier zu generieren, zielte die vorliegende Arbeit darauf ab, ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und zur Erstellung des Differentialblutbildes beim Huhn zu entwickeln.

3 Literatur

3.1 Die Blutzellen der Vögel

Die Geschichte der Vogelhämatologie reicht bis in die Anfänge des 20. Jahrhunderts zurück. Obwohl das Huhn bereits seit Hippocrates im fünften Jahrhundert als Versuchstier Verwendung gefunden hatte (Hutt 1933; Burton and Guion 1968), zeugt erst 1927 die Aufnahme der Spezies *gallus gallus* in das Buch „Blutmorphologie der Laboratoriumstiere“ (Klieneberger 1927) von einer systematischen hämatologischen Untersuchung dieser Spezies.

So sahen sich Lucas und Jamroz auch 1961 im Vorwort zu ihrem „Atlas of Avian Hematology“ noch am Anfang der Erforschung der normalen Blutmorphologie der Vögel (Lucas and Jamroz 1961). Mit ihrem als Nachschlagewerk dienenden „Bilderbuch“ wollten der Zytopathologe und der medizinische Illustrator dem Tierarzt und den auf den Gebieten Zoologie, Embryologie, Endokrinologie, Physiologie, Virologie und Ernährung tätigen Forschern ermöglichen, die Blutzellen der Vögel zu identifizieren. Schließlich könne man „aus einem Tropfen Blut eine Menge an Informationen über den Gesundheitszustand eines Organismus ziehen“.

Im Allgemeinen gelten die grundlegenden hämatologischen Prinzipien der Haussäugetiere auch für die Aviäre Hämatologie (Campbell and Ellis 2007; Lucas 1959). In hämatologischer Hinsicht weist das Blut der Vögel aber ebenso wie das der Reptilien, Amphibien und Fische gegenüber dem der Säugetiere wichtige Besonderheiten auf. So sind alle Blutzellen dieser Tierklassen kernhaltig (Schermer 1958).

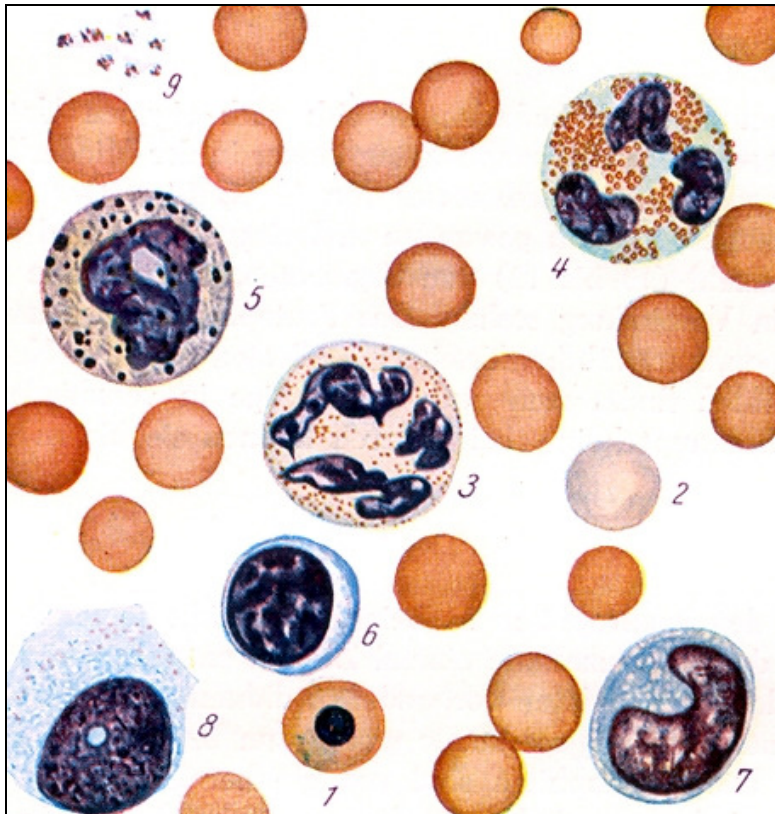


Abb. 1:
Säugetierblut, Affe (Schermer 1958)



Abb. 2:
Vogelblut, Huhn (Schermer 1958)

3.1.1 Erythrozyten

Während die Erythrozyten der Säuger kernlose, runde (bei den Tylopoden elliptische) (Wernery, Fowler, and Wernery 1999), bikonkave Scheiben darstellen, enthalten diese bei den anderen Wirbeltierklassen einen Zellkern und haben infolgedessen in der Mitte der elliptischen Scheibe eine bikonvexe Wölbung (Hawkey and Dennett 1990). Zudem enthalten sie Mitochondrien und vermutlich endoplasmatisches Retikulum (Bell and Freeman 1971, 1971). Die Erythrozyten von Vögeln sind weniger verformbar und haben eine höhere Konzentration an freiem zytoplasmatischem Hämoglobin als die der Säuger (Smith, West, and Jones 2000). Die Durchmesser von Hühnererythrozyten betragen etwa 7,5 bzw. 12,0 μm (Scheunert, Trautmann, and Wittke 1987). Die Erythrozyten anderer Vogelspezies variieren in ihrer Länge von 11 bis 16 μm und in ihrer Breite von 6 bis 10 μm (Fowler and Miller 2003). Die Erythrozytenzahlen in Vogelblut schwanken zwischen 1,5 und 6,6 Mio. pro mm^3 . (Welty 1975). Mit 28 bis 35 Tagen ist die Lebensdauer von Vogelerythrozyten vergleichsweise kurz (Rodnan, Ebaugh, and Fox 1957; Sturkie 1986).

3.1.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten der Vögel sind den Blutplättchen der Säuger homolog. Entgegen der Ansicht von Gross (Gross 1989) herrscht weitgehend Einigkeit darüber, dass sie an der Hämostase beteiligt sind (Carlson, Sweeny, and Tokaryk 1968; Abbey and Belliveau 1978; Maxwell and Trejo 1970; Chang and Hamilton 1979; Belamarich, Shepro, and Kien 1968; Lacoste-Eleau et al. 1994). Morphologisch unterscheiden sich die auf Grund ihres Aussehens auch als Spindelzellen bezeichneten Thrombozyten der Vögel deutlich von denen der Säuger (Schermer 1958). So sind reife Vogelthrombozyten nur etwas kleiner als die Erythrozyten und messen in ihrer Breite zwischen 3,9 und 5,0 μm und in ihrer Länge 8,1 bis 10,0 μm . Die Gestalt der Thrombozyten variiert von rund bis oval. Ihre Kerne sind etwas kleiner und weniger oval als die der Erythrozyten (Mc Entee 1984). Das Zytoplasma ist klar und farblos (Campbell and Ellis 2007). In reifen Thrombozyten lassen sich meist azidophile Granula nachweisen (Mukkur and Bradley 1967; Fowler and Miller 2003). Experimentell konnte gezeigt werden, dass Vogelthrombozyten über Phagozytoseaktivität verfügen (Awadhiya, Vegad, and Kolte 1980; Carlson, Sweeny, and Tokaryk 1968; Glick, Sato, and Cohenour 1964). Die für die Thrombozytenzahl in der Literatur bei vielen Spezies als physiologisch angegebenen Referenzwerte

schwanken stark, liegen aber meist zwischen 10 000 und 50 000 je mm³ (Fowler and Miller 2003; Thrall 2004).

3.1.3 Leukozyten

Auch hinsichtlich der Leukozyten weist Vogelblut einige Besonderheiten auf. Nach dem Ort ihrer Herkunft aus dem hämatoretikulären Gewebe des Knochenmarks oder aus dem lymphoretikulären Gewebe lassen sie sich in myeloische und lymphoide Leukozyten unterteilen. Mehr eingebürgert hat sich aber die Einteilung in granulierten und nicht granulierten Leukozyten. Die Agranulozyten umfassen dabei die Lymphozyten und Monozyten (Mehner and Hartfiel 1983). Der Name rührt daher, dass das Zytoplasma dieser Zellen im Gegensatz zu dem der Granulozyten - in der Regel - keine färbbaren Granula aufweist (Lucas and Jamroz 1961). Andere Autoren grenzen die Gesamtheit aus Lymphozyten und Monozyten dagegen als mononucleäre Zellen von den Granulozyten ab (Mc Entee 1984).

3.1.3.1 Lymphozyten

Die Lymphozyten stellen beim Huhn wie bei vielen anderen Vogelspezies den größten Anteil unter den Leukozyten (Campbell and Dein 1984). Morphologisch werden sie von manchen Autoren in kleine und große oder in kleine (<7,8 µm), mittlere (7,9 bis 10,3 µm) und große Lymphozyten (>10,4µm) eingeteilt (Lucas and Jamroz 1961). Den verschiedenen Typen werden jeweils unterschiedliche Aktivierungszustände oder Reifestadien zugeschrieben (Mc Entee 1984). Die Lymphozyten der Vögel ähneln denen der Säuger. Sie weisen ein hohes Kern/Zytoplasma-Verhältnis auf. Das Zytoplasma erscheint homogen schwach basophil und weist nur selten azurophile Granula auf. Der Kern ist rund, gelegentlich leicht eingezogen und zentral oder leicht exzentrisch gelegen (Campbell and Ellis 2007). Das Chromatin ist in der Regel dicht gepackt. Im peripheren Blut können auch Plasmazellen gefunden werden. Diese stellen sich als große Lymphozyten mit exzentrischem Kern, stark basophilem Zytoplasma und distinktem Golgiapparat dar (Campbell and Ellis 2007).

Die Lymphozyten der Vögel scheinen die gleichen vielfältigen Funktionen zu haben wie die der Säuger. Die B-Zellen tragen Immunglobuline auf der Oberfläche und differenzieren sich zu Plasmazellen. Die verschiedenen Populationen von T-Zellen sind maßgeblich an der zellmedierten Immunität beteiligt. Die Hauptorgane für die Lymphozytopoese sind als zentrale lymphatische Organe die für die B-Zellen

ursprünglich Namen gebende Bursa Fabricii und der Thymus - als periphere lymphatische Organe vorwiegend Milz, Zaekaltonsillen und Knochenmark (Campbell and Dein 1984).

3.1.3.2 Monozyten

Die Monozyten sind mit durchschnittlichen 12,1 µm Durchmesser typischerweise die größten Leukozyten im Blutausschlag (Lucas and Jamroz 1961). Ihre Gestalt ist rundlich bis amöboid. Der Kern ist nicht immer klassisch bohnenförmig sondern oft rund bis lobiert. In der Regel ist er blass und das Chromatin weniger dicht gepackt als bei den Lymphozyten. Das Zytoplasma stellt sich blau-grau dar, manchmal mit Vacuolen oder eosinophilen Granula. Oftmals weisen Monozyten eine hellere perinucleäre Plasmaregion und dunklere Areale in der Peripherie auf (Campbell and Ellis 2007). Ultrastrukturell lassen sich pinozytotische Vesikel und Lysosomen nachweisen (Dieterien-Lievre 1988) Monozyten verfügen über phagozytotische Aktivität und differenzieren sich bei ihrer Einwanderung in Gewebe zu Makrophagen (Campbell and Dein 1984). Sie zeigen oxidative Aktivität und produzieren reaktive Stickstoffverbindungen (Sung et al. 1991). Zudem haben die Monozyten immunregulatorische Funktionen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung von Antigenen (Rowley and Ratcliffe 1988). Die Unterscheidung zwischen Monozyten und Lymphozyten bereitet in der Vogelhämatologie mitunter große Schwierigkeiten, da beide Zelltypen über ein sehr variables Erscheinungsbild verfügen und somit zum Teil „Charakteristika“ des jeweils anderen Zelltyps aufweisen können (Lucas and Jamroz 1961).

3.1.3.3 Heterophile Granulozyten

Eine weitere Besonderheit des Vogelblutes stellen die heterophilen Granulozyten dar. Sie machen bei den Hühnervögeln die überwiegende Mehrzahl der Granulozyten aus (Feldman et al. 2000; Harmon 1998). Bei ihnen handelt es sich um das Pendant zu den neutrophilen Granulozyten der Säuger (Harmon 1998). Im Gegensatz zum Namen „neutrophil“ bezeichnet „heterophil“ aber hier nicht unmittelbar die Färbeeigenschaften dieser Zellen. Vielmehr sollte mit dieser Benennung darauf hingewiesen werden, dass sich die homologen Zellen dieses dritten Typs von Granulozyten (neben den Eosinophilen und Basophilen) in den verschiedenen Klassen der Wirbeltiere mikroskopisch sehr unterschiedlich darstellen (hetero = anders beschaffen, verschieden) (Pschyrembel, Dornblüth, and Zink 1990)

(Lucas and Jamroz 1961; Macrae and Spitznagel 1975). Obwohl die Heterophilen nur eine geringe Größenvariabilität aufweisen sollen, werden mit 6,35 µm bis 13,0 µm äußerst unterschiedliche Werte als durchschnittlicher Durchmesser angegeben (Lucas and Jamroz 1961; Feldman et al. 2000). Der reife Heterophile ist rund. Das Zytoplasma ist farblos, gefüllt mit rötlich-orangen, stäbchenförmigen Granula, die teilweise den Kern verdecken. Dieser ist zwei- bis dreifach lobiert und weist ein grobkörniges Chromatinmuster auf. Dass sich die Heterophilen ebenso wie die Eosinophilen Granulozyten durch Eosin anfärben, hat zu der heute kaum mehr verwendeten, mitunter verwirrenden Bezeichnung pseudoeosinophile Granulozyten geführt (Mc Entee 1984). Stabkernige Heterophile weisen nicht lobierte, oft hufeisenartige Kerne auf. Da der Kern oft durch die zytoplasmatischen Granula verdeckt ist, ist zur sicheren Identifikation eine Kernfärbung erforderlich, die wie das Hematoxin nicht die Granula anfärbt (Campbell and Ellis 2007). Es herrscht weitgehend Einigkeit darüber, dass die Heterophilen die gleiche Funktion haben wie die neutrophilen Granulozyten der Säuger. Sie sind stark phagozytotisch und entfalten in entzündlich verändertem Gewebe eine beachtliche bakterizide Wirkung (Topp and Carlson 1972, 1972). Bezüglich des Inhalts ihrer Granula und der Reaktion auf Stimulierung wurden aber deutliche Unterschiede zu den Neutrophilen nachgewiesen. So fehlen den Heterophilen die Myeloperoxidase und die alkalische Phosphatase und sie produzieren nur geringe Mengen an Sauerstoffradikalen (Brooks RL Jr, Bounous DI, and CB 1996; Kogut et al. 1998). Somit sind vermutlich überwiegend Sauerstoff-unabhängige Mechanismen wie die Beta-Defensine hauptverantwortlich für die antimikrobielle Aktivität der Heterophilen (Harmon 1998).

3.1.3.4 Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten sind meist fast rund und mit einer durchschnittlichen Größe von 7,3 µm etwas kleiner als die anderen Granulozyten (Lucas and Jamroz 1961). Innerhalb eines Ausstrichs können sie aber beträchtliche Größenunterschiede aufweisen (Campbell and Dein 1984). Das Zytoplasma färbt sich in einem blassen, klaren blau, wird aber bisweilen von den stark eosinophilen Granula überdeckt (Lucas and Jamroz 1961). Der Kern ist lobiert und färbt sich in der Regel stärker an als bei heterophilen Granulozyten (Campbell and Ellis 2007). Die Granula sind meist rund und hell, rot bis pink. Eine Peroxidase-Färbung kann zur Differenzierung der Peroxidase-negativen Heterophilen von den Peroxidase-positiven Eosinophilen durchgeführt werden (Campbell and Ellis 2007). Es wird postuliert, dass die

Eosinophilen Granulozyten der Vögel ähnliche Funktionen haben wie die der Säuger (Campbell and Ellis 2007). Dafür spricht dass ihre Zahl bei parasitären Infektionen und allergischen Reaktionen erhöht sein kann (Campbell and Dein 1984; Dein 1984). Eine Beteiligung an Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ wird diskutiert, ist aber wie auch die Bedeutung im Rahmen der Parasitenabwehr noch nicht eindeutig belegt (Maxwell 1984; Feldman et al. 2000).

3.1.3.5 Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten des Huhns sind nur wenig kleiner als die Heterophilen. Ihr Zytoplasma ist farblos. Die Granula sind basophil und verdecken oft den Zellkern. Manchmal ist dieser aber als runder, blass-blauer Körper im Zentrum der Zelle zu erkennen. Zweifache Lappung tritt selten, dreifache niemals auf. Die Granula sind alkoholischen Lösungen gegenüber empfindlich und konfluieren mitunter in Wright's-Färbungen oder lösen sich auf (Feldman et al. 2000). Mit etwa 2% der Leukozyten finden sich mehr Basophile im Vogelblut als bei den Säugern (Lucas and Jamroz 1961). Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt, es wird aber angenommen, dass sie die gleichen Aufgaben haben wie die Basophilen und Mastzellen des Säugers, da ihre zytoplasmatischen Granula Histamin enthalten (Rowley and Ratcliffe 1988). Sie sind beteiligt an akuten Entzündungen und Typ IV Hypersensitivitätsreaktionen (Carlson and Allen 1969; Fox and Solomon 1980). Die Basophilen sind mit die ersten Leukozyten die im Zuge der frühen Immunantwort ins Gewebe austreten (Katiyar, Vegad, and Awadhiya 1992).

3.2 Blutentnahme

Es sind zahlreiche Techniken zur Blutentnahme beim Vogel beschrieben. Je nach Spezies, Zahl der zu gewinnenden Proben, erforderlichem Blutvolumen und Verfügbarkeit einer Hilfsperson werden verschiedene Methoden bevorzugt. Als Standardentnahmetechnik gilt bei den meisten Vögeln die Punktion der Vena jugularis dextra (Korbel 1990, 2001). Häufig wird aber auch die Vena ulnaris, in der Literatur auch mit anderen Namen wie Vena basilica oder Vena cutanea ulnaris bezeichnet, zur Punktion herangezogen (Campbell 1995; Baumel 1979). Entsprechende bebilderte Anleitungen zur korrekten Fixation und Blutentnahme finden sich in der Literatur (König and Bragulla 2001; Korbel 1990; Schermer 1958; <http://www.fao.org>).

Die Entnahme von Blut aus dem Herzen (Glaenz 1933) oder dem Sinus occipitalis sollte nur bei einer anschließenden Tötung des Tieres durchgeführt werden. Das als toenail clipping bezeichnete Abzwicken einer Krallenspitze im lebenden Gewebe ist wegen der Kontaminationsgefahr für die Probe und aus Tierschutzgründen abzulehnen (Harrison and Harrison 1986; Flammer 1989, 1989; Graham 1987). Zudem ist die Qualität von auf diese Weise gewonnenen Blutproben oft nicht ausreichend für die hämatologische Untersuchung, da sie ungewöhnliche Zellverteilungen und Artefakte aufweisen (Campbell 1995). Das Gesamtblutvolumen eines gesunden Vogels entspricht ungefähr 6 bis 11 ml je 100 g Körpergewicht (Sturkie 1965). Das entzogene Blutvolumen sollte 10% des gesamten Blutvolumens oder als Richtwert 1% der Körpermasse nicht überschreiten (Russo et al. 1986). Einige Autoren halten allerdings auch eine Entnahme von 20% des Blutvolumens für vertretbar (Gylstorff-Sassenhoff and Grimm 1998; Chand and Eyre 1978). Den Empfehlungen in der Literatur zu Folge sollten keine zu englumigen Kanülen für die Blutentnahme verwendet werden um die entnahmebedingte Zelllyse zu minimieren (Fudge 2000; Fudge 1994). Wie bei Säugern sollte die Blutentnahme durch eine geübte Person zügig durchgeführt werden, um Gerinnungsartefakte zu minimieren. Die Verwendung lyophilisierter Antikoagulanzen wird empfohlen, um Verdünnungseffekte zu vermeiden (Fudge 2000).

3.3 Antikoagulanzen

EDTA (Ethyldiamintetraazetat) gilt als das Antikoagulans der Wahl für die hämatologische Untersuchung bei Vögeln. Es erlaubt eine einwandfreie Anfärbung der Zellen und führt nicht zur Verklumpung von Leukozyten (Campbell 1995; Hawkey and Dennett 1990; Harrison and Harrison 1986). Allerdings erwähnt Chand, dass EDTA oft zur Degranulation der Basophilen und damit zu falsch niedrigen Basophilenzahlen führen könne (Chand and Eyre 1978). Die Blutproben sollten bei Raumtemperatur gelagert werden. Denn die Kühlung von EDTA-Blut von Vögeln kann zu Veränderungen der Zellen führen, die auch von erfahrenen Pathologen nur schwer von pathologischen Zuständen unterschieden werden können (Harrison and Lightfoot 2006). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass mit EDTA ungerinnbar gemachtes Taubenblut bei 4°C schneller hämolysiert als bei Raumtemperatur (Hattingh and Smith 1976). EDTA-Konzentrationen zwischen 1,0 und 2,0 mg EDTA/ml Blut gelten bei Säugern und Vögeln als empfehlenswert (Jacobson and Kollias 1988). Von höheren Konzentrationen wird abgeraten, da diese zur

Schrumpfung der Erythrozyten führen können. (Schalm, Jain, and Carroll 1975; Uko and Ataja 1996). Bei EDTA Konzentrationen über 3,75 mg/ml wurde eine starke Blaufärbung des Blutausriches und Veränderungen der Leukozyten beobachtet (Robertson and Maxwell 1993). Bei Taubenblut wurde eine vollständige Hemmung der Gerinnung aber nur bei EDTA Konzentrationen zwischen 4 und 7 mg/ml erreicht (Hattingh and Smith 1976). Die Untersuchung des Blutes sollte innerhalb von 3 bis 4 Stunden nach der Entnahme erfolgen. Blutausriche sollten sofort angefertigt werden - entweder aus frischem oder mit EDTA versetztem Blut (Campbell 1995). EDTA kommt in Blutentnahmeröhrchen in drei verschiedenen Formen zum Einsatz. K_2EDTA , K_3EDTA und Na_2EDTA . Während K_2EDTA und Na_2EDTA auch in trockener Form zum Einsatz kommen, liegt K_3EDTA in flüssiger Form vor. Die Verwendung flüssiger Antikoagulanzen ermöglicht eine schnellere Durchmischung mit dem Blut, führt aber zu einer Verdünnung der Probe. K_2EDTA ist etwas besser löslich als Na_2EDTA und wird vom International Council for Standards in Hematology für die Humanmedizin empfohlen (ICSH 1993). EDTA wirkt als Komplexbildner, der den für die Gerinnung erforderlichen Cofaktor Kalzium bindet.

Grundsätzlich gilt es zu bedenken, dass alle Antikoagulanzen eine schädigende Wirkung auf Zellen haben können (Kraft and Schillinger 1989; Plonait 1980).

Heparinisiertes Blut hat zwar den Vorteil, dass das Plasma für die Blutchemie verwendet werden kann. Es ist aber weder für eine Schätzung des Fibrinogengehaltes am zentrifugierten Mikrohämatokritröhrchen noch für eine exakte Zählung der weißen Blutkörperchen geeignet (Harrison and Lightfoot 2006). Heparin kann die Färbung der Zellen beeinträchtigen, was zu Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Morphologie im Blutausrich und zu fehlerhaften Leukozytenzählungen führt (Meyer and Harvey 2004; Dein 1984; Fredlin 1985) (Fudge 2000; Campbell 1995; Hawkey and Dennett 1990; Harrison and Harrison 1986). Da Leukozyten und Thrombozyten durch Heparin verklumpen können, resultieren mitunter fehlerhafte Zellzählungen (Thrall 2004; Campbell and Ellis 2007; Meyer and Harvey 2004). Lediglich bei einigen Vogelspezies (einige Rabenvögel, Kraniche, Hokkohühner, Fasanenartige, Nashornvögel, Emus und der Afrikanische Strauß), deren Blut durch EDTA hämolysiert wird, muss Heparin zum Einsatz kommen. (Harrison and Lightfoot 2006; Ritchie, Harrison, and Harrison 1994; Jacobson and Kollias 1988; Meyer and Harvey 2004). Während Campbell Natrium-

Citrat-Blut lediglich für Gerinnungsanalysen empfiehlt (Thrall 2004), ist Fudge der Ansicht, dass dieses auch für die Durchflusszytometrie vorzuziehen sei (Fudge 1995; Fudge 2000).

3.4 Blutausstriche

Vogelblutzellen, insbesondere Leukozyten, zeigen beim Anfertigen von Blutausstrichen eine besonders starke Fragilität. Die in der Säugetiermedizin routinemäßig eingesetzten Ausstrichtechniken können deshalb bei Vogelblut oft zu minderwertigen Präparaten führen. Dabei finden sich oft sogenannte „smudged cells“ (verschmierte Zellen), die in der Regel zerrissene und nicht mehr zu identifizierende Leukozyten repräsentieren. Derartige Präparate resultieren in Fehlern bei der Quantifizierung und Identifizierung der Zellen (Fudge 2000). Harrison ist der Ansicht, dass es mit der coverslip-to-slide-Technik und der slide-to-slide-Technik nur zwei allgemein akzeptierte Verfahren zur Erstellung von Blutausstrichen aus Vogelblut gäbe (Harrison and Lightfoot 2006). Bei der beliebteren coverslip-to-slide-Technik würden beim Ausstreichen weniger rote Blutkörperchen zerstört. Bei dem Verfahren wird ein Blutstropfen auf einen Objektträger aufgebracht. Ein langes Deckgläschen wird dann quer zum Objektträger über den Tropfen gelegt. Unter Ausübung sanften Drucks werden zum Ausstreichen Objektträger und Deckglas in entgegengesetzter Richtung aneinander vorbeigezogen. Bei der slide-to-slide-Technik wird der Blutstropfen ebenfalls auf einem Objektträger platziert. Dann wird ein zweiter Objektträger mit der kürzeren Kante links vom Tropfen in einem spitzen Winkel (30-45°) aufgesetzt und an diesen herangeführt, so dass sich das Blut über seine Kante verteilt. Dann wird sofort der zweite Objektträger bis zum Ende des ersten geschoben (Harrison and Lightfoot 2006).

Die slide-to-slide-Technik oder wedge-smear-Technik findet sich bei Campbell (Campbell and Ellis 2007) als push-slide oder standard-Technik. Seiner Meinung nach gewährleistet sie in der Regel eine gleichmäßige Verteilung der Zellen und zur mikroskopischen Beurteilung geeignete Monolayer-Felder. Allerdings käme es bei zu starkem Druck leicht zur Zellzerstörung. Um Zellschädigungen zu minimieren empfiehlt er, zunächst einen Tropfen einer Lösung von Bovinem Serum Albumin aufzubringen und auf diesen dann den Blutstropfen. Die two-coverslip-Technik wird von einigen Autoren bevorzugt, weil sie die Zellzerstörung weitestgehend reduziere (Altman 1997; Todd et al. 1974; Dein 1984). Die Technik wird bereits von Wirth beschrieben (Wirth 1931). Auf ein Deckglas wird ein Tropfen Blut gegeben. Dann

wird ein zweites Deckglas um 45° gedreht, auf den Tropfen gelegt oder fallen gelassen und nachdem sich das Blut zwischen beiden Deckgläsern ausgebreitet hat werden diese parallel voneinander abgezogen. Graphisch dargestellt sind die Standardmethode und die Deckgläschenmethode in „Veterinary laboratory medicine : interpretation & diagnosis“ (Meyer and Harvey 2004). In der Literatur werden noch zahlreiche weitere Ausstrichtechniken beschrieben. Eine erschöpfende Diskussion der Verfahren und der ihnen von den einzelnen Autoren zugeschriebenen Vor- und Nachteile würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es wurden bereits vergleichende Untersuchungen über die verschiedenen Ausstrichtechniken unter Verwendung von Vogelblut durchgeführt. In den Untersuchungen Reauz' konnte, die Angaben von Campbell, Dein und Fudge (Campbell 1995; Fudge 1989; Dein 1984) nach denen es bei der parallelen Ausstrichmethode zwischen zwei Deckgläsern zu einer vergleichsweise niedrigeren Anzahl zerstörter Zellen komme nicht bestätigt werden (Reauz et al. 1999). Sie bekräftigen vielmehr die Aussage Wirths, dass bei dieser Methode zwar eine gleichmäßige Zellverteilung aber auch vermehrt zerdrückte Zellen zu erwarten seien. Allerdings gibt Wirth auch zu bedenken: „Mit welcher Ausstrichart man bessere Ergebnisse erhält, ist schließlich Sache der Übung“ (Wirth 1931). In der Literatur finden sich bezüglich Vogelblut keine Hinweise auf den Einsatz von automatisierten Techniken, nach der Schleuderausstrichmethode oder der Linearausstrichmethode, wie sie in der Humanmedizin eingesetzt werden (Wintrobe and Greer 2004). Selbst durch die gleichmäßigere Leukozytenverteilung beim Einsatz von Zentrifugationsgeräten zur Anfertigung von Blutausstrichen können die anderen methodischen Fehler der mikroskopischen Zählung allerdings nicht beseitigt werden (Stiene-Martin 1980; Wenk 1976; Nourbakhsh et al. 1978; Hubl et al. 1997).

Die fachgerechte Fixierung des aus Vogelblut hergestellten Blutausstrichs ist von großer Wichtigkeit. Die intrazytoplasmatischen Granula der Heterophilen und Basophilen sind wasserlöslich. Deshalb müssen die Ausstriche vor der Färbung fixiert werden. Zudem sollen in schlecht fixierten Vogelblutausstrichen zerstörte Kerne von Erythrozyten zu finden sein. Dem kann aber durch den Einsatz von Färbelösungen auf Methanolbasis begegnet werden. So werden die Ausstriche gleichzeitig fixiert und gefärbt (Harrison and Lightfoot 2006).

3.5 Das weiße Blutbild

Die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl gilt als eine der wichtigsten hämatologischen Untersuchungen bei der Beurteilung des Gesundheitszustandes eines Individuums. (Harrison and Lightfoot 2006). Gesamtleukozytenzahlbestimmung und Differentialblutbilderstellung gehören zu den am häufigsten durchgeführten Laboruntersuchungen in der Humanmedizin (Pierre 2002).

Verschiebungen bei den Leukozytenzahlen geben besonders wertvolle Hinweise, weil sie bei gesunden Individuen relativ konstant sind, sich aber beim Vorliegen einer Krankheit deutlich verändern können. Leukozytenantworten sind zwar in der Regel nicht pathognomonisch. Sie können aber wertvolle Informationen liefern, die dabei helfen, eine Differentialdiagnose zu bestätigen, den Therapieerfolg zu überwachen und eine Prognose abzugeben (Latimer and Rakich 1989; Feldman et al. 2000). Veränderungen in der Homeostase der Leukozyten lassen sich durch das weiße Blutbild nachweisen. Dazu gehören die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl, das Differentialblutbild, die Berechnung der absoluten Zahlen der verschiedenen Leukozytenfraktionen je μl Blut und die morphologische Beurteilung der Leukozyten am gefärbten Blutaussstrich. Die Summe all dieser Untersuchungen ergibt das Leukogramm.

Verglichen mit den Säugern ist die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl bei Vögeln aber durch die Interferenzen der kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten erschwert. Zudem führen Schwierigkeiten bei der Leukozytendifferenzierung zu Verwechslungen innerhalb der Leukozyten und damit zu fehlerhaften Differentialblutbildern (Fowler and Miller 2003).

3.5.1 Interpretation des Leukogramms beim Vogel

Nur etwa 3% aller im Organismus vorhandenen reifen Leukozyten findet man im Blut. Das Blut dient den weißen Blutkörperchen also vor allem als Transportmedium (Scheunert, Trautmann, and Wittke 1987). Eine physiologische Leukozytenzahl im Blut kommt dabei durch ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Bedarf in verschiedenen Geweben zu Stande. Veränderungen der Leukozytenzahl reflektieren eine Belastung des Systems und die Beteiligung verschiedener Leukozytentypen an der Antwort erlaubt Rückschlüsse auf das zu Grunde liegende Problem oder ätiologische Agens (Fowler and Miller 2003).

Für die Beurteilung des Differentialblutbildes beim Vogel ist es wichtig zu wissen, dass die Anteile der verschiedenen Leukozytenfraktionen bei verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich sind. So überwiegen bei einigen Vogelarten die Heterophilen bei anderen die Lymphozyten. Man spricht deshalb auch von einem heterophilen oder einem lymphozytären Blutbild. Bei Hühnern (Lucas 1959) findet man ebenso wie bei Puten (Sturkie 1965), Fasanen (Hanusova and Pujman 1970), Wachteln (Nirmalan and Robinson 1971), Enten (Magath and Higgins 1934) und Tauben (Shaw 1933) ein überwiegend lymphozytäres Blutbild. Auch das Blutbild vieler Greifvögel weist mehr Lymphozyten als Granulozyten auf (Kolb 1958). Bei der Waldohreule aber zum Beispiel dominieren die Heterophilen (Veil 1978). Bei verschiedenen Greifvogelarten wurden auffallend hohe Prozentsätze an Eosinophilen nachgewiesen (Veil 1978; Kolb 1958).

Die Leukozytenzahlen und das Differentialblutbild variieren aber auch abhängig von individuellen Faktoren wie Rasse, Alter und Geschlecht (Mehner and Hartfiel 1983). Bereits Lucas und Jamroz (Lucas and Jamroz 1961) berichten von genetisch bedingten hämatologischen Unterschieden zwischen verschiedenen Hühnerlinien. Latimer beruft sich bei seiner Aussage, dass California Gray Hühner physiologischerweise mehr Heterophile als Lymphozyten besäßen auf eine Arbeit von Swayne. Von den vier von Swayne untersuchten California Gray Hühnern hatten aber lediglich zwei mehr Heterophile als Lymphozyten. Dabei war eines der Tiere am Tag der Blutentnahme lethargisch und wies aussergewöhnlich hohe Heterophilen- und Monozytenzahlen auf. Somit muss eine krankheitsbedingte Heterophilie in Betracht gezogen werden und die Schlussfolgerung Latimers erscheint nicht gerechtfertigt (Swayne, Stockham, and Johnson 1986; Latimer et al. 1988). Für Puten wurde gezeigt, dass zwischen verschiedenen Linien Unterschiede bezüglich hämatologischer Parameter bestehen (Bayyari et al. 1997). Das Blut frisch geschlüpfter Hühnerküken soll zwar arm an Leukozyten aber relativ reich an Heterophilen und Basophilen sein (Bell and Freeman 1971; Burton and Harrison 1969). So fanden Anderson und Stephens bei frisch geschlüpften Broilerküken zwischen 55 und 80 Prozent Heterophile Granulozyten (Anderson and Stephens 1970). Viele Autoren konnten keinen statistisch signifikanten Geschlechtsdimorphismus hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl nachweisen (Mehner and Hartfiel 1983). Nach Lucas und Jamroz (Lucas and Jamroz 1961) haben jedoch erwachsene Hennen mehr Leukozyten als Hähne. Aufgrund der

Aufregung durch die Manipulation kommt es bei Vögeln bei der Blutentnahme üblicherweise zu einer physiologischen Leukozytose bei der eine Erhöhung der Heterophilen und der Lymphozytenzahlen zu beobachten ist (Thrall 2004). Als Ursachen für eine Leukozytose kommen Entzündungen - infektiöser oder nicht infektiöser Genese - Vergiftungen, Traumata, schwere Blutungen in die Körperhöhlen, schnell wachsende Tumoren und Leukämie in Frage. Eine starke Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl kann darauf hindeuten, dass eine vorliegende Infektion bakterieller Art ist. Wiederholte Blutuntersuchungen können zur Verlaufskontrolle einer antibiotischen Therapie eingesetzt werden (Bush and Smith 1980). Das Differentialblutbild kann dabei helfen, die Ursache einer Leukozytose genauer zu eruieren. Beim Vorliegen einer Entzündung ist meist ebenfalls eine Heterophilie anwesend. Die Stärke der Heterophilie ist abhängig von der Ursache und der Schwere der Entzündung.

In wissenschaftlichen Untersuchungen wird die Bestimmung des Verhältnisses zwischen heterophilen Granulozyten und Lymphozyten vielfach als Maß für die Streßbelastung von Hühnern genutzt (Al-Murrani et al. 2006; Al-Murrani, Al-Rawi, and Raof 2002). Im Zuge dessen findet die Bestimmung des heterophilen Granulozyten/Lymphozyten-Verhältnisses bereits Anwendung bei der Zucht stress- bzw. krankheitsresistenter Hühnerlinien (Fowler and Miller 2003).

Bei Stress erhöht sich die Heterophilenzahl, während die Gesamtleukozytenzahl mehr oder weniger unverändert bleibt. Steigt hingegen auch die Gesamtleukozytenzahl an, ist eher eine Infektion zu vermuten (Gross 1983). Möglicherweise führen auch Toxine zu einer Verschiebung des Verhältnisses Heterophile/Lymphozyten. Abhängig vom Toxin kann es zu einer Verschiebung in die eine oder andere Richtung kommen (Tangredi 1981). Unreife Heterophile finden sich selten im Blut der Vögel. Wenn sie auftreten, kann dies auf einen extremen Verbrauch in der Peripherie mit Verdrängung des reifen Pools im hämatopoetischen Gewebe hindeuten, insbesondere in Kombination mit einer Leukopenie, wie sie bei schwersten Entzündungen vorkommt (Thrall 2004). Monozytosen sind oft assoziiert mit Infektionskrankheiten, die typischerweise zu Granulomen führen können, wie Mykobakteriose, Chlamydiose und Aspergillose. Chronische bakterielle Granulome und massive Gewebnekrosen können ebenfalls zu Monozytosen führen (Wight, Dewar, and Mackenzie 1980). Außerdem wurden diese bei verschiedenen Mangelernährungen wie z.B. Zinkmangel beobachtet (Thrall 2004). Weil über die

genaue Funktion der Eosinophilen beim Vogel keine Klarheit herrscht, ist es schwer Eosinophilien zu interpretieren. Möglicherweise verhalten sich die Eosinophilen der Vögel anders als die der Säuger (Maxwell and Burns 1986). Studien haben gezeigt, dass sie möglicherweise anders als bei den Säugern an allergischen Reaktionen vom Typ IV beteiligt sind. (Maxwell 1980). Obwohl Eosinophilien im Zusammenhang mit gastrointestinalem Nematodenbefall beschrieben sind, gelang es nicht diese mit Parasitenantigenen experimentell auszulösen (Maxwell et al. 1990; Maxwell et al. 1991). Es wurde über eine durch Nahrungsentzug ausgelöste, stressinduzierte Basophilie bei Hühnern berichtet, die möglicherweise abhängig vom Alter der Tiere oder der Dauer des Stresses ist (Montali 1988; Carlson and Hacking 1972). Obwohl Basophile an der initialen Phase von Entzündungen beteiligt zu sein scheinen, kommt es dabei offensichtlich zu keiner Erhöhung der Basophilenzahl im Blut (Maxwell M. H. and W. 1995; Mischke 2003).

3.5.2 Das automatisierte weiße Blutbild

Aufgrund der hohen Präzision, Richtigkeit und Schnelligkeit (Pierre 2002) der automatischen Hämatologie-Analysegeräte, werden Blutproben in der Humanmedizin überwiegend automatisiert untersucht. Nur die Proben bei denen das Gerät versagt, oder bei denen dieses aufgrund von Besonderheiten eine Überprüfung anfordert, werden mikroskopisch beurteilt (Feldman et al. 2000). Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Funktionsprinzipien der kommerziell erhältlichen Hämatologie-Analyseapparate erläutert. Eine etwas ausführlichere Beschreibung der Arbeitsweise dieser Geräte findet sich bei Feldmann et al. (Feldman et al. 2000). Eines der wichtigsten Verfahren, das bei der automatischen Blutanalyse zum Einsatz kommt, ist die Impedanz-Messung. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und passieren im „Gänsemarsch“ die Messstelle. Die Änderung des Widerstandes zwischen zwei Elektroden beim Durchtritt einer Zelle kann detektiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Größe führen kleine und große Zellen zu unterschiedlichen Widerstandsänderungen. Auf diese Weise konnten schon sehr früh in kommerziellen Geräten Erythrozyten und Thrombozyten unterschieden und gezählt werden. Nach Lyse der Erythrozyten z.B. durch Saponin war auch die Gesamtleukozytenzahl zu ermitteln. Durch technische Weiterentwicklungen liefern modernere Geräte auch dreiteilige (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) oder sogar fünfteilige (Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, Basophile) Differentialblutbilder.

Einige Geräte kombinieren die Impedanzmessung mit der Durchflusszytometrie, andere arbeiten rein durchflusszytometrisch. Die zweite für die Entwicklung der Hämatologieanalysegeräte so bedeutende Technik, die Durchflusszytometrie, lässt sich vereinfacht folgendermaßen beschreiben: Wie bei der Impedanzmessung werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt. Anschließend passieren sie einen Lichtstrahl, der in den meisten Fällen durch einen Laser erzeugt wird. Über Photomultiplier oder Photodioden wird von der Zelle gebeugtes und gestreutes Licht erfasst. Die Beugung des Lichtstrahls erlaubt einen Rückschluss auf die Zellgröße. Durch die Lichtstreuung kann auf die Granuliertheit oder Dichte der Zelle geschlossen werden. In manchen Geräten wurde diese Technik nochmals weiter entwickelt. Hier wird im Rahmen der sogenannten Multi Angle Polarized Scatter Separation die Streuung des Lichtes in verschiedenen Winkeln in Relation zum Laserstrahl gemessen. Auf diese Weise kann neben der Zellgröße auch die Komplexität der Zelle (Kern-Zytoplasma-Verhältnis), die Granularität der Zelle und die Lobularität des Kerns erfasst werden. Zudem wird ein Teil des Lichtes polarisiert. Eosinophile werden unter anderem dadurch identifiziert, dass ihre Granula das polarisierte Licht streuen. Andere Geräte kombinieren die Durchflusszytometrie mit einer automatisierten Cytochemie. Dabei werden die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Peroxidaseaktivität differenziert (Tvedten and Korcal 1996; Neuerer 2005; Moritz 2000; Moritz et al. 2004; Roleff 2004; Jain 1993; Weiser 1987; Püsch 2002).

3.5.3 Versuche zur automatisierten Blutbilderstellung beim Vogel

Durch die Einführung der Hämatologie-Analyse-Automaten hat nun auch die Säugetierhämatologie in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht. Mittlerweile konnten einige für die Humanmedizin entwickelten Geräte so adaptiert werden, dass die Untersuchung von Blut verschiedener Haussäugetierspezies weitgehend möglich ist (Ettinger and Feldman 2005; Wintrobe and Greer 2004; Feldman et al. 2000). Zudem konnten für verschiedene Säugerspezies Referenzbereiche ermittelt werden, die es nun ermöglichen, die Abweichungen vom „Normalzustand“ festzustellen. In zahlreichen Experimenten wurden die Leukozytenreaktionen untersucht und viele klinische Erfahrungen publiziert (Lucas and Jamroz 1961; Campbell 1995; Campbell and Ellis 2007).

Im Gegensatz dazu steckt die Vogelhämatologie noch „in den Kinderschuhen“. Die Morphologie der Blutzellen der Vögel wurde beschrieben (Campbell 1995) und es

wurden manuelle Techniken zur Leukozytenzählung entwickelt (Natt and Herrick 1952; Costello 1970; Dein 1982; Feldman et al. 2000). Entscheidende Fortschritte in der Vogelhämatologie wurden aber bisher verhindert, da automatisierte Untersuchungsverfahren und Referenzbereiche für alle wichtigen Vogelspezies fehlen. Zudem kann nicht in ausreichender Form auf Ergebnisse experimenteller Studien zurückgegriffen werden (Campbell 1995).

Campbell ist der Auffassung, dass die Anwesenheit kernhaltiger Thrombozyten und Erythrozyten den Einsatz elektronischer Partikelzählgeräte bei der Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl bei Vögeln ausschließe. Er weist darauf hin, dass neben intakten Erythrozyten und Thrombozyten auch die bei einer Lyse der Erythrozyten freiwerdenden Kerne zu Interferenzen führen. Auch beim versuchsweisen Einsatz der Durchflusszytometrie zur automatisierten Gesamtleukozytenzahlbestimmung bei Vögeln würden Thrombozyten und Erythrozyten die Messung stören (Lilliehook et al. 2004).

Während mittlerweile auch in der Säugetiermedizin routinemäßig für die Humanmedizin entwickelte Hämatologie-Analyse-Automaten eingesetzt werden, finden sich in der Literatur nur vereinzelte Hinweise auf Untersuchungen von Vogelblut mit automatisierten Verfahren (Bounous and Stedtman 2000; Steel et al. 1977). Mit Zellcountern ist die Bestimmung der Erythrozytenzahl auch beim Vogel gelungen. Zu Beeinträchtigungen kann es aber bei stark erhöhten Leukozyten- und Thrombozytenzahlen sowie bei Proben von sehr anämischen Vögeln kommen (Post, Rebel, and ter Huurne 2003). Versuche, die verfügbaren Geräte für die Leukozytenzählung und –differenzierung von Vogelblut zu adaptieren, verliefen überwiegend erfolglos. Nur eine Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift berichtet von zufrieden stellenden Ergebnissen beim Einsatz eines Hämatologie-Zellcounters beim Vogel (Fudge 2000). Fudge erwähnt Blut von Papageien, Sperlingsvögeln, Wasservögeln und Lauffögeln mit dem Cell-Dyn 3500 untersucht zu haben. Für die Untersuchung von Blutproben mancher Vogelspezies seien Anpassungen in der Software erforderlich um Thrombozyten von Lymphozyten unterscheiden zu können. Die Proben könnten bis zu drei Tagen nach der Entnahme untersucht werden. Das in den Main Conference Proceedings der Association of Avian Veterinarians 1995 enthaltene abstract endet mit dem Hinweis, dass in der Präsentation vorläufige Präzisionsdaten, die publiziert werden sollen, erörtert würden. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt findet sich allerdings keine weitere

Informationen enthaltende Publikation von Fudge zu diesem Thema. In einem fünf Jahre später von ihm herausgegebenen Buch schreibt er, die vielversprechende Technologie der Laser Flow Cytometry bedürfe noch der Verbesserung. Auf die Probleme eingehend erklärt er, es seien für die verschiedenen Vogelspezies aufgrund ihrer unterschiedlichen Leukozytenmorphologie verschiedene Geräteeinstellungen erforderlich. Außerdem gesteht Fudge Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen Thrombozyten und Lymphozyten ein (Reauz 1996). Reauz berichtet gar, dass mit dem Cell-Dyn 3500 eine Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten und Granulozyten nicht gut möglich war. Lediglich bei der Messung des Hämatokrits und der Gesamtleukozytenzahl sei ein befriedigendes Ergebnis erzielt worden. Als mögliche Ursache für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen ihrer Arbeit und denen von Fudge gibt Reauz die verwendete Software an, da Fudge keine näheren Angaben zu der von ihm verwendeten Software bzw. deren genauen Einstellungen mache. Sie habe die Version 1:44 eingesetzt (Reauz 1996). In ihrer Arbeit hat Reauz Vogelblut mit noch einem weiteren Hämatologie-Automaten (MS9, Melet Schloesing, Frankreich) untersucht. Dabei seien für die Parameter Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Gesamtleukozytenzahl, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten Werte erzielt worden, die gut mit den mit Standardmethoden ermittelten Ergebnissen übereinstimmten (Lilliehook et al. 2004). Darüber hinausgehende Publikationen über den Einsatz dieses Gerätes zur Untersuchung von Vogelblut konnten allerdings nicht gefunden werden. Lilliehook hat Hühnerblut mit dem gleichen Gerät (Cell-Dyn 3500, Abbott Diagnostics) wie Fudge und Reauz untersucht. Die damit erzielten Granulozytenwerte hätten zwar eine „annehmbare“ Genauigkeit aufgewiesen. Trotz des Einsatzes der vom Hersteller angebotenen Spezialsoftware VET 2.3 mit besonderen Einstellungen für die Untersuchung von Vogelblut seien die Lymphozytenzahlen jedoch vollkommen ungenau gewesen, zumal bei Mehrfachmessungen der gleichen Proben zum Teil beachtliche Differenzen zwischen den Messergebnissen zu verzeichnen gewesen seien. So hat Lilliehook wenig Hoffnung, dass die automatisierte Untersuchung von Vogelblut ähnlich gut funktionieren kann wie die bei den Säugern (Campbell and Dein 1984).

Die Beurteilung des buffy coat im zur Bestimmung des Hämatokrits zentrifugierten Microhämatokritröhrchen ermöglicht naturgemäß nur eine grobe Schätzung der Leukozytenzahl (Wardlaw and Levine 1983). Die zuerst in der Humanmedizin (Fischer et al. 1989; Feldman et al. 2000; Brown and Barsanti 1988; Levine, Hart,

and Wardlaw 1986) eingesetzte Quantitative Buffy Coat-Technologie ermöglicht wie beim Menschen auch bei verschiedenen Haussäugetieren eine schnelle ungefähre Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl sowie die Erstellung eines Differentialblutbildes. Kommerziell erhältlich ist auch ein speziell für die Veterinärmedizin optimiertes und validiertes Gerät, QBC VetAutoread Hematology System (IDEXX, Inc., Westbrook, ME) zur Durchführung der Quantitative buffy coat analysis (QBC) (Seidl 2003). Durch Zentrifugation werden die Zellen aufgrund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes separiert. Die Innenwände der QBC-Kapillaren sind mit Acridinorange und Kalium-Oxalat beschichtet. Kaliumoxalat führt über eine osmotisch bedingte Schrumpfung der Erythrozyten zu einer Erhöhung ihres spezifischen Gewichtes und schnellerer Sedimentation. Durch einen Schwimmkörper in der QBC-Kapillare wird der buffy coat in die Länge gezogen und damit besser beurteilbar. Aufgrund der unterschiedlichen Anfärbung mit Acridinorange sowie verschiedener Fluoreszenzen durch RNA, Lipoproteine und DNA werden die verschiedenen Zellschichten identifiziert und quantifiziert. Seidl testete das Verfahren an Blutproben von Psittaziden. Der einzige Parameter der an Vogelblut zuverlässig bestimmt werden konnte, war jedoch der Hämatokrit (Campbell and Dein 1984). Ursache für die nicht zufrieden stellenden Ergebnisse für die anderen Parameter war offensichtlich die nicht exakte Auftrennung der einzelnen Zellbanden.

3.6 Mikroskopische Verfahren zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl beim Vogel

Die gewöhnlichen elektronischen Partikelzählverfahren und die üblichen Zählkammerverfahren können zur Ermittlung der Gesamtleukozytenzahl in Vogelblut nicht eingesetzt werden (Campbell and Ellis 2007).

Eine Hauptursache dafür ist in der Kernhaltigkeit der Erythrozyten der Vögel zu sehen. Die Erythrozyten werden entweder nicht durch die gewöhnlichen Lyse-Puffer aufgelöst, oder falls dies doch gelingt, interferieren die frei werdenden Kerne mit den Standard-Zählverfahren. Deshalb wurden zahlreiche manuelle Verfahren zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in Vogelblut entwickelt (Campbell and Dein 1984). Viele dieser Techniken sind zeitaufwändig und erfordern die Herstellung von Färbelösungen aus verschiedenen Reagenzien und mit sehr unterschiedlicher Haltbarkeit (Zinkl 1986). Im Wesentlichen lässt sich die Vielzahl aller in der Literatur beschriebenen oder in der Praxis eingesetzten Verfahren auf zwei grundsätzliche Herangehensweisen reduziert darstellen. Das erste auch als „indirekt“ bezeichnete

Verfahren besteht darin, am gefärbten Blutausschlag das Verhältnis zwischen Leukozyten und Erythrozyten zu ermitteln und die Gesamtleukozytenzahl dann mit Hilfe einer vorher durchgeführten Zählung der roten Blutkörperchen zu errechnen. Der zweite - oder „direkte“ - Ansatz ist, die Leukozyten in Suspension anzufärben und in einem Hämozytometer zu zählen (Kozma 1930). Im folgenden werden exemplarisch einige der zahlreichen manuellen Verfahren beschrieben.

Die erste Beschreibung eines Verfahrens zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl bei dem sich „die Blutzellen bei Vögeln (...) schon in der Zählkammer aufgrund einer Differential-Färbung von einander unterscheiden lassen“, beruht auf der Nutzung einer Eosin und Trypanblau beinhaltenden Färbelösung (Wiseman 1931). Dieses Verfahren wird heute nicht mehr genutzt.

3.6.1 Direkte Verfahren

3.6.1.1 Phloxin B-Färbung

Eine auch heute noch häufig eingesetzte Methode beinhaltet die Färbung der Heterophilen und Eosinophilen mit einer Phloxin B-Lösung. Phloxin B wird üblicherweise zur spezifischen Anfärbung von Eosinophilen Granulozyten im Säugerblut benutzt. Die Anwendung des Verfahrens auf Vogelblut wurde erstmals 1931 beschrieben (Lucas and Jamroz 1961) und von Lucas und Jamroz später modifiziert (Costello 1970). Die Methode wurde vereinfacht durch das kommerziell erhältliche Eosinophil Unopette 5877 System (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ), das zur Bestimmung der absoluten Konzentration eosinophiler Granulozyten in Säugerblut entwickelt wurde (Dein 1982; Campbell and Ellis 2007). Dabei wird die Blutprobe 1:32 mit der Phloxin B-Lösung verdünnt. Dies geschieht durch Überführung des Blutes mit der mitgelieferten 25 µl-Pipette in die mit Phloxin B-Lösung gefüllte Unopette. Anschließend wird eine Neubauer-Zählkammer mit dem Gemisch aus Blut und Phloxin B beschickt und in einer feuchten Kammer für mindestens 5 Minuten inkubiert. Die angefärbten Eosinophilen und Heterophilen Granulozyten werden auf beiden Seiten der Zählkammer in den insgesamt 18 Groß-Quadraten gezählt. Mit dem Zählen darf nicht zu lange gewartet werden, weil sich nach längerer Zeit auch die Erythrozyten anfärben. Die Gesamtzahl der Heterophilen und Eosinophilen Granulozyten wird mit folgender Formel berechnet:

$$(\text{Heterophile} + \text{Eosinophile})/\text{mm}^3 = \frac{\text{eosin-gefärbte Zellen} \times 10 \times 32}{18}$$

Um die Gesamtzahl aller Leukozyten ermitteln zu können, muss nun bestimmt werden welchen Anteil Heterophile und Eosinophile an der Summe aller Leukozyten ausmachen. Dazu wird zusätzlich zur Phloxinfärbung am gefärbten Blutausschrieb mikroskopisch ein Differentialblutbild erstellt. Anschließend kann die Gesamtleukozytenzahl errechnet werden:

$$\text{Leukozyten}/\text{mm}^3 = \frac{(\text{Heterophile} + \text{Eosinophile})/\text{mm}^3 \times 100}{\% \text{ Heterophile und Eosinophile}}$$

Durch Zusammenfassung der beiden Formeln ergibt sich die Gesamtleukozytenzahl als:

$$\text{Leukozyten}/\text{mm}^3 = \frac{\text{eosin-gefärbte Zellen} \times 1,111 \times 16 \times 100}{\% \text{ Heterophile und Eosinophile}}$$

Und durch mathematische Vereinfachung als:

$$\text{Leukozyten}/\text{mm}^3 = \frac{\text{eosin-gefärbte Zellen} \times 1778}{\% \text{ Heterophile und Eosinophile}}$$

Aufgrund der Kombination von Zählkammervorgängen und Blutausschrieb wird das Verfahren auch als semidirekt bezeichnet (Campbell and Ellis 2007). Ein Nachteil dieser Technik ist darin zu sehen, dass die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl vom Differentialblutbild abhängig ist. Insbesondere bei Blutproben in denen die Zahl der Granulozyten kleiner ist als die der mononukleären Zellen, werden die Ergebnisse deshalb ungenauer (Lucas and Jamroz 1961). Dies gilt es bei der Untersuchung von Blut von Spezies mit überwiegend lymphozytärem Blutbild wie dem Huhn zu bedenken (Natt and Herrick 1952).

Noch heute häufig angewandte direkte Verfahren zur Leukozytenzählung beim Vogel sind beispielsweise das Verfahren nach Natt und Herrick (Shaw 1930), Shaw (Zinkl 1986; Joseph et al. 1989) und das Toluidine Blau Verfahren (Fowler and Miller 2003; Campbell and Ellis 2007) (Natt and Herrick 1952).

3.6.1.2 Verfahren nach Natt und Herrick

Eine direkte Methode zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl ist das Verfahren mit der Färbelösung nach Natt und Herrick (Campbell and Ellis 2007). Dazu muss die Blutprobe 1:200 mit der Färbelösung verdünnt werden. Dies kann entweder in einer gewöhnlichen Erythrozyten-Pipette geschehen oder durch Zugabe von 20 µl Blut zu 4 ml Färbelösung. Die Leukozyten färben sich dunkelblau an und können mit dem Mikroskop in der Zählkammer ausgezählt werden. Üblicherweise werden alle dunkelblauen Zellen in den neun Großquadraten gezählt (Voigt 2000).

Die Gesamtleukozytenzahl ergibt sich damit aus der Formel:

$$\text{Leukozyten/mm}^3 = \frac{\text{dunkelblaue Zellen in 9 Großquadraten} \times 10 \times 200}{9}$$

Anstatt mit 10 zu multiplizieren und durch 9 zu dividieren wird oft vorgezogen: 10% zur gezählten Zahl zu addieren und dann mit 200 zu multiplizieren (Thrall 2004). Dargestellt als Formel ergibt dieser Rechengang:

$$\text{Leukozyten/mm}^3 = (\text{dunkelblaue Zellen in 9 Großquadraten} + 10 \%) \times 200$$

Der Vorteil der Methode nach Natt und Herrick besteht darin, dass die Gesamtzahlen der Erythrozyten und Thrombozyten im gleichen Arbeitsgang ebenfalls bestimmt werden können (Robertson and Maxwell 1990). Ein Nachteil ist, dass es oft schwierig ist, zwischen kleinen Lymphozyten und Thrombozyten zu unterscheiden. Zur Verbesserung der Differenzierung zwischen diesen beiden Zelltypen wird die Einhaltung einer Färbezeit von 60 Minuten empfohlen (Zinkl 1986; Joseph et al. 1989).

3.6.1.3 Toluidin Blau-Verfahren

Eine weitere verbreitete direkte Methode zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl beinhaltet die Verdünnung des ungerinnbar gemachten Blutes 1:100 mit 0,01% Toluidine Blau in PBS vor der Beschickung einer Neubauer-Zählkammer (Campbell and Ellis 2007). Toluidine Blau färbt Leukozyten blau, Erythrozyten blass-orange und Thrombozyten blass-blau. Es werden in neun Großquadraten alle blauen Zellen gezählt, deren Durchmesser mindestens der Breite der Erythrozyten entspricht (Campbell and Ellis 2007). Auf diese Weise sollen die Thrombozyten ausgeschlossen werden, die eher kleiner als die Breite der Erythrozyten sind. Kleine Lymphozyten sind eher gleich groß oder größer als die Erythrozytenbreite. Unreife Erythrozyten sollen von kleinen Lymphozyten durch ihre runde bis unregelmäßige Gestalt, den runden, zentral gelegenen Kern mit dunklem unregelmäßig kondensiertem Chromatin und das geringe Volumen eines basophilen hyalinen Zytoplasmas unterschieden werden können (Coles 1986; Schalm and Jain 1986; Fonio 1912). Die Gesamtleukozytenzahl errechnet sich dann aus:

$$\text{Leukozyten/mm}^3 = \frac{\text{gezählte Zellen in 9 Großquadraten} \times 10 \times 100}{9}$$

oder:

$$\text{Leukozyten/mm}^3 = (\text{gezählte Zellen in 9 Großquadraten} + 10 \%) \times 100$$

Wenn viele unreife Erythrozyten in der Blutprobe vorliegen, kann eine korrigierte Gesamtleukozytenzahl errechnet werden:

$$\text{Leukozyten korrigiert /mm}^3 = \frac{\text{Errechnete Gesamtleukozytenzahl} \times 100}{100 + \text{Zahl der unreifen Erythrozyten} / 100 \text{ Leukozyten}}$$

3.6.2 Indirekte Verfahren

3.6.2.1 Schätzung der Gesamtleukozytenzahl anhand des Blutausstrichs

Neben den Zählkammerverfahren wird bei der Untersuchung von Vogelblut auch auf Verfahren zurückgegriffen, die versuchen die Gesamtleukozytenzahl anhand des gefärbten Blutausstrichs zu schätzen.

Zahlreiche Varianten der Methode wurden publiziert und ehemals auch zur Bestimmung von Leukozyten und Thrombozytenzahlen bei Säugern und dem Menschen eingesetzt (Wirth 1931). Bereits Wirth hatte das „älteste Verfahren“ zur „Zählung der Blutkörperchen und Blutplättchen beim Geflügel“, „nach dem bisher ausschließlich gearbeitet wurde“ ausführlich beschrieben und kommentiert. Nach der Zählung aller „zelligen Gebilde“ mittels Mischpipette, Verdünnungsflüssigkeit und Zählkammer empfiehlt er folgendes Vorgehen: „Im gefärbten Trockenausstrich zählt man dann mit Hilfe eines Zähllokulars eine möglichst große Zahl (wenigstens 3000) von Erythrozyten, von weißen Blutkörperchen und von Blutplättchen aus, worauf die einzelnen Größen aus der Gesamtzahl der zelligen Gebilde in Kubikmillimeter berechnet werden können“ (Wirth 1950).

Die aus dem Vorgehen abgeleiteten Formeln lauten:

$$\text{Erythrozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Gesamtzellzahl} / \mu\text{L} \times \text{Erythrozyten}}{\text{Erythrozyten} + \text{Leukozyten} + \text{Thrombozyten}}$$

$$\text{Leukozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Gesamtzellzahl} / \mu\text{L} \times \text{Leukozyten}}{\text{Erythrozyten} + \text{Leukozyten} + \text{Thrombozyten}}$$

$$\text{Thrombozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Gesamtzellzahl} / \mu\text{L} \times \text{Thrombozyten}}{\text{Erythrozyten} + \text{Leukozyten} + \text{Thrombozyten}}$$

Der Autor beschreibt das Verfahren als „sehr ungenau“ und legt dar, dass man erst dann „ungefähr gleich bleibende Werte“ erhalte, „wenn man mehr als 10000 Erythrozyten ausgezählt hat.“ Auch zwei Jahrzehnte später, in der zweiten Auflage des Buches, schreibt Wirth genauso wie in der ersten: „Weitere Untersuchungen müssen ergeben, welches Verfahren in Zukunft als Zählmethode für die Geflügelblutkörperchen anerkannt zu werden verdient“ (Schalm and Jain 1986).

Zinkl rät von der Verwendung eines Schätzverfahrens (Gesamtleukozytenzahl = Leukozyten in 8 Ölimmersionsfeldern x 1000) ab (Weiss 1984). Im Gegenzug beschreibt er zwei Methoden, die die Schätzung mit Zählkammerverfahren kombinieren. Eine Variante sieht vor zunächst mit der Zählkammer eine Erythrozytenzählung vorzunehmen. In einem zweiten Schritt wird die Zahl der Erythrozyten je Sichtfeld im Mikroskop geschätzt. Auf die gleiche Weise wird die Leukozytenzahl je Sichtfeld ermittelt. Die Gesamtleukozytenzahl ist dann zu errechnen mit der Formel:

$$\text{Leukozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{Erythrozyten} / \mu\text{L} \times \text{Leukozyten} / \text{Sichtfeld}}{\text{Erythrozyten} / \text{Sichtfeld}}$$

Als Variation nennt er die Möglichkeit die Erythrozyten und Leukozyten je Sichtfeld exakt zu zählen anstatt zu schätzen.

In Verbindung mit dem Schätzverfahren am gefärbten Blutaussstrich wird in der aktuellen Literatur erstaunlicherweise die Schätzung oder gar Zählung der Erythrozyten im Ausstrich und/oder der Zählkammer durchgängig nicht mehr erwähnt. Stattdessen wird von einer konstanten Zahl an Erythrozyten je Sichtfeld ausgegangen. Als Bedingung für die Anwendbarkeit des Verfahrens wird lediglich genannt, dass die Leukozytenzählung in einem „Monolayer“-Bereich des Blutaussstrichs erfolgt. Dieser Bereich sei dadurch gekennzeichnet, dass sich die Hälfte der Erythrozyten berühren (Campbell and Ellis 2007; Campbell 1995). Campbell setzt voraus, dass sich in einem solchen Monolayer-Ölimmersions-Sichtfeld (100fache Vergrößerung) im Allgemeinen 200 Erythrozyten befinden. In 5 Sichtfeldern erwartet er dementsprechend 1000 Erythrozyten. Als zweite Annahme wird vorausgesetzt, dass die Vogelblutproben, deren Hämatokrit im Bereich von 35 –

55% liegt, einen Erythrozytengehalt von 3,5 Mio je μL aufweisen (Lane 1991). Campbell leitet daraus folgende Formel ab:

$$\text{Leukozyten / } \mu\text{L} = \frac{(\text{durchschnittliche Leukozytenzahl / 5 Sichtfelder}) \times 3,500,000}{1000}$$

Auf den gleichen Prinzipien beruht das Schätzverfahren nach Lane (Fowler and Miller 2003). Dabei werden mit dem 40x-Objektiv in 10 Sichtfeldern die Leukozyten gezählt. Die durchschnittliche Leukozytenzahl je Feld wird dann mit 2000 multipliziert. Selbst wenn man eine ideale Verteilung der Zellen im Blutaussstrich voraussetzt, sind in den Schätzverfahren nach Campbell und Lane wichtige Faktoren nicht berücksichtigt. So wird z.B. den je nach Spezies sehr unterschiedlichen Parametern Erythrozytengröße und Erythrozytengehalt nicht Rechnung getragen. Eine Aussage darüber, ob sich diese durch gegensinnige Veränderung (Spezies mit vielen kleinen Erythrozyten und Spezies mit wenigen großen Erythrozyten) teilweise aufheben, bleiben die Autoren schuldig. Naturgemäß dürften aber im Monolayer-Sichtfeld eines Blutaussstrichs von einem Kolibri (6,6 Mio Erythrozyten/ μL , Erythrozytendurchmesser 6 bzw. 11 μM) erheblich mehr Erythrozyten als in dem eines Straußes (1,5 Mio Erythrozyten/ μL , Erythrozytendurchmesser 10 bzw. 16 μM) (Welty 1975) zu finden sein. (Coles 1986) Als weiterer unberücksichtigter Faktor sind die Charakteristika des verwendeten Mikroskops zu nennen. Schließlich wäre bei Verwendung eines Mikroskopes dessen Okular eine Feldzahl von 32 besitzt das Sichtfeld (Objektfeld) flächenmäßig etwa dreimal so groß wie bei einem Mikroskop dessen Okular über eine Feldzahl von 18 verfügt. In der Literatur ist bisher merkwürdigerweise keine Modifikation der Formeln von Campbell und Lane beschrieben, welche die Feldzahl des verwendeten Mikroskops als Faktor berücksichtigt.

Einen einfach durchzuführenden Kompromiss zwischen dem völligen Verzicht der Berücksichtigung der beschriebenen Faktoren und der aufwändigen Auszählung der Erythrozyten im Sichtfeld beschreibt Coles im Rahmen eines Protokolls für die Untersuchung von Säugerblut (Coles 1986; Campbell 1984). Er empfiehlt in einigen Sichtfeldern die auf dem Durchmesser des Sichtfeldes liegenden Erythrozyten zu zählen. Aus der durchschnittlichen Zahl der Erythrozyten je Durchmesser solle dann durch die Division durch 2 die Zahl der durchschnittlichen Erythrozyten je Radius errechnet werden. Mit Hilfe der leicht abgewandelten Formel zur Berechnung der

Fläche eines Kreises sei dann die durchschnittliche Erythrozytenzahl je Sichtfeld zu errechnen. Während Coles diesen Wert anschließend in seine (etwas andere, da auf Säugerblut mit einem Erythrozytengehalt von 7 Mio/ μ l abgestimmte) Schätzformel integriert, verzichten Campbell und Lane auf diesen Schritt. Stattdessen empfiehlt Campbell lediglich, wie auch von Coles beschrieben, bei vom Referenzbereich (35-55%) abweichenden Hämatokritwerten die geschätzte Leukozytenzahl mit folgender Formel zu korrigieren (Russo et al. 1986):

$$\text{Korrigierte Leukozyten} / \mu\text{L} = \frac{\text{geschätzte Leukozytenzahl} \times \text{gemessener Hämatokrit (\%)}}{45\%}$$

Eine vergleichende Studie kam zu dem Schluss, dass unter Idealbedingungen Schätzverfahren eine größere Variabilität aufweisen können als Zählkammerverfahren (Fudge 2000). Unter weniger idealen Bedingungen wie z.B. einer suboptimalen Qualität der Blutprobe, kann die Schätzung am Blutaussstrich nach Meinung anderer Autoren aber verlässlichere Zahlen liefern (Campbell and Ellis 2007). Campbell selbst beurteilt Schätzverfahren als nicht geeignet zur routinemäßigen Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl bei Vögeln (Gering and Atkinson 2004). Er empfiehlt den Einsatz nur dann, wenn direkte Zählverfahren nicht durchführbar sind.

Erstaunlicherweise finden sich in der Literatur keine Hinweise auf Versuche die Zuverlässigkeit der mikroskopischen Blutbilderstellung bei Vögeln durch den Einsatz von Software zur Digitaler Bildverarbeitung zu erhöhen. Auf diesem Wege könnte die Zählung/Schätzung der Erythrozyten bzw. Gesamtzahl der Zellen/ Sichtfeld vermutlich äußerst zuverlässig erfolgen (Fowler and Miller 2003; Dein 1982). Die Leukozyten könnten sofern möglich ebenfalls automatisiert ansonsten beispielsweise am Bildschirm weiterhin durch den menschlichen Untersucher identifiziert und differenziert werden und in Relation zur Gesamtzahl an kernhaltigen Zellen gesetzt werden. Über eine zusätzliche volumenbasierte Zählung aller kernhaltigen Zellen beispielsweise mit einem Zellcounter könnte bei verringertem Arbeitsaufwand vermutlich eine wesentlich höhere Genauigkeit gegenüber den augenblicklich verwendeten Schätzverfahren erreicht werden.

3.7 Erstellung des Differentialblutbildes beim Vogel

Die Erstellung des Differentialblutbildes erfolgt bei der Untersuchung von Vogelblut in der Regel am gefärbten Blutausstrich. Zur Leukozytendifferenzierung wird von Schnelfärbungen abgeraten, da sie bei Vogelblut mitunter zu erheblicher Zellzerstörung führen können (Hauska et al. 1999). Hauska berichtet über eine mangelhafte Anfärbung der Granula der Basophilen nach DiffQuick und Haemacolor-Schnelfärbung (Hauska et al. 1999; Dein 1982). Andere Romanovsky-Färbungen (Wright, Giemsa, Wright-Giemsa, Leishman, Wright-Leishman May-Grünwald, May-Grünwald-Giemsa) sind zwar zeitaufwändiger, führen aber zu besseren Ergebnissen (Harrison and Lightfoot 2006) (Shen and Patterson 1983). Eine vereinfachte Wright's Färbung zur Routineuntersuchung von Vogelblut wurde publiziert (Dein 1982). Der Kombination aus Wright's und Giemsa wird nachgesagt eine hervorragende morphologische Differenzierung zu erlauben (Fowler and Miller 2003).

Die Genauigkeit des Differentialblutbildes hängt ab von der korrekten Identifikation der verschiedenen Zelltypen. Zudem wird diese aber durch andere Faktoren beeinflusst wie Qualität des Blutausstrichs und der Färbung, sowie von dem gewählten Zählverfahren. Bei der Leukozytendifferenzierung an Vogelblutausstrichen kommt es leicht zu Verwechslungen (Kass, Harrison, and Lindheimer 2002). Dass noch in jüngster Vergangenheit neue Färbeverfahren publiziert werden, die eine bessere Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen ermöglichen sollen, verdeutlichen dies (Lucas and Jamroz 1961; Campbell 1995). Auch die ausführlichen Anweisungen zur korrekten Identifizierung der Zelltypen zeugen von den Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von z.B.: Monozyten versus Lymphozyten, kleine Lymphozyten versus Thrombozyten, Heterophile versus Eosinophile (Campbell and Dein 1984). Zudem erschwert wird das Differentialblutbild dadurch, dass sich in Ausstrichen von Vogelblut viel mehr zerstörte Zellen finden als bei Säugern (Schalm, Jain, and Carroll 1975).

Die Auszählung des Differentialblutbildes kann nach verschiedenen Methoden erfolgen. In der Literatur ist beschrieben, dass sich die verschiedenen Zellen im Ausstrich von Säugerblut nicht gleichmäßig verteilen (Lilliehook et al. 2004; Tvedten and Korcal 1996). Insbesondere große Zellen wie die Monozyten tendieren zu einer unregelmäßigen Verteilung im Blutausstrich (Pierre 2002). Leukozyten finden sich in einer größeren Konzentration an den Rändern des Blutausstrichs und in dem als Fahne bezeichneten Ende des Ausstrichs. Zudem kommen große Zelltypen eher an

den Rändern und am Ende des Blutausrichs zu liegen, während kleine Zellen im Zentralbereich stärker vertreten sind. (Stiene-Martin 1980; Dein 1982). Nach Dein kommt es besonders bei der keilförmigen Ausstrichmethode auch bei Vogelblut zu einer ungleichmäßigen Verteilung der verschiedenen Zellen (MacGregor 1949; Schalm and Jain 1986). Um die ungleichmäßige Verteilung im Blutausrich bei der Erstellung des Differentialblutbildes zu kompensieren, wurden verschiedene Empfehlungen zum systematischen mikroskopischen „Abfahren“ des Ausstrichs gegeben. Beschrieben sind unter anderem die Straight-edge- (Auszählung nur entlang des Längsrandes des Objektträgers), Cross-sectional- (Zickzacklinie zwischen den beiden Längsrändern) und die Battlement-Methode (entlang des Längsrandes, zinnenartig, alternierend in horizontaler und vertikaler Richtung)(CLSI 2007). Das Clinical and Laboratory Standards Institute (früher National Committee for Clinical Laboratory Standards) empfiehlt den Blutausrich bei der Auszählung mit der Battlement-Methode abzufahren (Koepke 1980). Die dort zitierte Battlement-Technik (Schalm and Jain 1986) unterscheidet sich aber von der von Schalm (Koepke 1977) beschriebenen insofern, dass hier die zinnenartige Durchmusterung nicht längs des Objektträgers verläuft, sondern in Querrichtung im Bereich des Monolayers.

3.8 Die Variabilität des Weißen Blutbildes

Der Erfolg der Hämatologie-Analyse-Geräte beruht zum großen Teil darauf, dass sie in kurzer Zeit eine viel größere Anzahl an Zellen zählen können, als ein menschlicher Untersucher mit dem Mikroskop. Die niedrige Anzahl gezählter Zellen beim mikroskopischen Differentialblutbild - im Laboralltag meist nur 100 oder 200 Zellen – resultiert schließlich in einem hohen statistischen Fehler. Dieser ist in der Humanmedizin die bedeutendste Fehlerquelle beim mikroskopischen Differentialblutbild. Ausführlich diskutiert wurde diese Problematik 1977 auf der College of American Pathologists Conference (Pierre 2002; Lilliehook et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit werden die Aspekte der Statistik im Kapitel 5. Diskussion genauer erörtert. In der Literatur wird darauf hingewiesen, dass sich bei einem Vorgehen wie bei der Phloxin B-Färbung mit Berechnung von absoluten Zahlen für die verschiedenen Leukozytenfraktionen sich die Fehler aus der Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und aus dem Differentialblutbild addieren können (Gross 1984).

Pierre ist zwar der Überzeugung, dass bei der mikroskopischen Differenzierung von Blutaussstrichen aus Humanblut durch gut ausgebildete Untersucher der Fehler durch Verwechslungen der verschiedenen Zellen gering sei. Aufgrund der bereits ausführlich beschriebenen Schwierigkeiten bei der Differenzierung der aviären Leukozyten und Thrombozyten muss aber davon ausgegangen werden, dass es hier häufiger zu Verwechslungen kommt. Die Errechnung absoluter Zahlen aus der Gesamtleukozytenzahl und den im Differentialblutbild festgestellten Prozentsätzen dürfte bei der Untersuchung von Vogelblut deshalb weitaus stärker durch die Addition beider Fehler belastet sein. Es wäre deshalb zu erwarten, dass bei der Methode nach Natt und Herrick der Fehler durch die immerhin volumenbasierten Zählkammer möglicherweise geringer ist als bei der Schätzung am Blutaussstrich. Schätzverfahren am Blutaussstrich und Zählkammerverfahren zwingen im Alltag jedoch beide zu einem Kompromiss zwischen Genauigkeit und Zeitaufwand (Mandy, Nicholson, and McDougal 2003; Cassens et al. 2004).

3.9 Durchflusszytometrie

In der zellbiologischen Forschung hat sich mit der Durchflusszytometrie eine äußerst leistungsfähige Technik zur Differenzierung und Zählung verschiedenster in Suspension vorliegender Zellen etabliert.

Die Technik wird seit Jahren in der humanmedizinischen Routinediagnostik eingesetzt. Klassisches Beispiel dafür ist die Zählung der CD4-positiven T-Zellen im Rahmen der AIDS-Diagnostik und für Verlaufskontrollen bei HIV-Patienten (Grimaldi et al. 2005). Ähnliche Anwendungen der Durchflusszytometrie sind die Zählung von Monozyten (Alvarez-Larran et al. 2002; Fornas, Garcia, and Petriz 2000) und hämatopoetischen Zellen (Uchiyama et al. 2005; Moritomo et al. 2002).

Es ist nicht dokumentiert, dass es jemandem gelungen ist, mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein praxistaugliches automatisiertes Verfahren zu entwickeln, welches eine Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl sowie die Erstellung eines Differentialblutbildes beim Huhn oder anderen Vögeln ermöglicht.

Zwar wurde bereits ein durchflusszytometrisches Verfahren publiziert, das auf der Verwendung membranaffiner Farbstoffe wie 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide ($\text{DiOC}_5(3)$) beruht (Inoue et al. 2002). Den Erstbeschreibern zu Folge, soll sie den Vorteil bieten, bei verschiedenen Vogelspezies einsetzbar zu sein (Kaspers, Lillehoj, and Lillehoj 1993; Kothlow et al. 2005; Kothlow et al. 2007; Kothlow et al. 2008). Die ursprünglich für die Zählung von Blutzellen bei Fischen entwickelte Technik hat sich

bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber weder in der Forschung noch in der Routinediagnostik durchgesetzt.

Andere Durchflusszytometrische Techniken werden in der Wissenschaft auch von verschiedenen Arbeitsgruppen die das Immunsystem des Huhnes erforschen zur Identifizierung und Zählung unterschiedlicher Leukozytenfraktionen eingesetzt (Chan et al. 1988; Chen, Lehmeyer, and Cooper 1982; Chen, Chanh, and Cooper 1984).

In Forschungsarbeiten zur Hühnerimmunologie geht der Untersuchung von Leukozytensubpopulationen in der Regel die Isolierung der Leukozyten mit Hilfe spezieller Zentrifugationstechniken voraus, um sie von den störenden und nicht lysierbaren Erythrozyten abzutrennen (Burgess and Davison 1999). Auf diese Weise aufbereitete Proben erlauben jedoch keine absolute Quantifizierung der betreffenden Zellen bezogen auf das Blutvolumen (Andreasen and Latimer 1989). Zudem enthalten solche üblicherweise mit Hilfe der „slow speed“- oder der „Ficoll-Dichte-Gradienten“-Zentrifugation hergestellten Zellpräparationen keine oder nur mehr sehr wenige Granulozyten, da diese zusammen mit den Erythrozyten abgetrennt werden (Burgess and Davison 1999).

In der Literatur ist eine Methode zur durchflusszytometrischen Zählung von Leukozyten-Subpopulationen in Hühnerblut beschrieben (Hoffman et al. 1980). Die Technik basiert im Wesentlichen auf dem beispielsweise in der Humanmedizin bei der AIDS-Diagnostik und AIDS-Therapieüberwachung routinemäßig für die Quantifizierung der CD4 positiven T-Helferzellen eingesetzten Verfahren. Es werden dabei direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte monoklonale Antikörper eingesetzt. Dies erlaubt ein Vorgehen nach dem No-Wash Prinzip (Chapple et al. 2000). Dabei wird im Gegensatz zu indirekten Färbungen auf Waschschriffe verzichtet. Dies kann als Grundvoraussetzung für die Quantifizierung von Zellen angesehen werden, da absolute wie auch selektive und damit relative Zellverluste bei der Probenvorbereitung und Färbung vermieden werden (Bohls et al. 2006). Das Verfahren wird unter anderem auch zur Zählung von Vorläufern Dendritischer Zellen sowie zur Zählung von CD34⁺ Stammzellen eingesetzt (Campbell 1995). Das von Burgess et al. benutzte Verfahren unterscheidet sich aber von den üblicherweise z.B. in der Humanmedizin eingesetzten Methoden durch Anwendung des No-Lyse No-Wash-Prinzips. Angesichts der Tatsache, dass sich Vogelerythrozyten bisher nicht lysieren lassen, ohne auch die Leukozyten schwer zu schädigen oder zu zerstören, wird bei diesem Verfahren auf die Zugabe lysierender Puffer verzichtet. Stattdessen

wird die Blutprobe vor der Messung stark verdünnt, um eine Zellkonzentration zu erhalten, die vom Durchflussszytometer noch verarbeitet werden kann. Um dennoch eine ausreichende Anzahl an Leukozyten erfassen zu können, muss die Messdauer auf ein Vielfaches erhöht werden, da es sich ja bei der überwiegenden Mehrzahl der in der Probe vorhandenen Zellen um Erythrozyten handelt. Burgess et al. greift zusätzlich auf die Technik der absoluten Quantifizierung mittels in bekannter Konzentration zugegebener Partikel (Polystyrene beads) zurück, um absolute Zellzahlen ermitteln zu können. Weiterentwicklungen der von Burgess beschriebenen Technik, die eine Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und die Erstellung eines umfassenden Differentialblutbildes erlauben, sind bisher nicht bekannt geworden. Gleiches gilt für die von Bohls publizierte durchflussszytometrische Methode zur Unterscheidung von Hühnerlymphozyten von kontaminierenden Thrombozyten (Campbell 1995; Harrison and Lightfoot 2006).

Angesichts der bisher nicht gelösten Schwierigkeiten bei der automatisierten Untersuchung von Vogelblut wird bislang also in der Vogelmedizin immer noch weitgehend auf arbeitsaufwändige und unzuverlässige mikroskopische Verfahren zurückgegriffen oder ganz auf diese wichtigen hämatologischen Untersuchungen verzichtet.

Deshalb besteht weiterer Forschungsbedarf ein automatisiertes Verfahren zu entwickeln, das diese Probleme überwindet. Denn ein solches Verfahren würde die Erforschung der Vogelhämatologie beflügeln (Campbell 1995).

4 Material und Methoden

4.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden Blutproben von Hühnern der Linien M11 und LSL und verwendet. Die Bruteier der LSL-Tiere stammten aus der LSL-Rhein-Main Verkaufsniederlassung Gut Heinrichsruh, die der M11-Hühner aus dem Institut für Tierzucht in Mariensee bezogen. Die Eier wurden unter Standardbedingungen bebrütet und die Hühner in kleinen Gruppen zunächst in Gitterrostkäfigen und später in Volieren gehalten. Alle Tiere wurden gegen die Marek'sche Krankheit geimpft und erhielten handelsübliches Alleinfutter, Muschelgrit und Wasser ad libitum.

4.2 Gewinnung von heparinisiertem Blut

Je nach Bedarf und Größe des Tieres wurden zur Blutentnahme 1, 2, 5 oder 10 ml-Spritzen⁴ verwendet, die vorher mit 0,05 bis 0,2 ml Heparinlösung (500 U/ml) (s 4.4.1) beschichtet wurden. Kleine Spritzen wurden mit Kanülen kleineren Durchmessers (Ø 0,7 mm x 30 mm, 22G x 1¼“, Farbcode schwarz)⁷ und große mit Kanülen größeren Durchmessers (Ø 0.9 mm x 40 mm, 20G x 1½“, Farbcode gelb)⁷ kombiniert. Die Blutentnahme erfolgte aus der rechtsseitigen Vena jugularis.

4.3 Gewinnung von EDTA-Blut

Am Anfang des Projektes wurde überwiegend heparinisiertes Blut für die Untersuchungen verwendet, später ausschließlich EDTA-Blutproben.

4.3.1 Monovetten

Meistens wurden die Proben von juvenilen Tieren vor der Legereife gewonnen. Dabei kamen S-Monovetten, Kalium-EDTA, 1,2 ml¹⁸ zum Einsatz - in Kombination mit der S-Monovetten-Kanüle Ø 0,8 mm/Länge 38mm, Ausführung 21G x 1½“, Nr.2, Farbcode grün¹⁸

4.3.2 Vacutainer

Es war im Verlauf der Arbeit wiederholt aufgefallen, dass Blutproben legereifen Hennen trotz Verwendung von EDTA, am dritten Tag nach der Entnahme geronnen waren. Beim Einsatz höherer EDTA-Konzentration (4,8 anstatt 1,8 mg/ml) passierte dies nicht mehr. Fortan wurden also immer dann, wenn EDTA-Blut von bereits

legenden Hühnern für die Untersuchungen verwendet wurde, höhere Konzentrationen an EDTA eingesetzt.. Dazu wurden 1,5 ml Blut durch eine Kanüle (schwarz Ø 0,7mm x 30mm, 22G x 1¼")⁷ in eine 2,0 ml Spritze entnommen. Dann wurde das Blut sofort in ein Vacutainer-Röhrchen 7,2 mg K₂EDTA Vakuum 4,0 ml⁴ überführt. Dazu wurde mit der immer noch auf der Spritze befindlichen Kanüle die Gummikappe des Vacutainers durchstoßen. Auf diese Weise wurde das Blut durch das Vakuum in das Röhrchen eingesogen.

Bei allen eingesetzten Blutentnahmeverfahren wurden die Probengefäße unmittelbar nach dem Befüllen 10 mal vorsichtig invertiert, um das Blut mit dem Antikoagulans zu mischen und die Bildung von Gerinnseln zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur auf einen Taumel-Rollenmischer gelegt, um eine kontinuierliche und schonende Durchmischung zu gewährleisten.

4.4 Gewinnung von Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) von Hühnern

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Medien und Zusätze bei 4 °C gelagert.

4.4.1 Material

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

8,0 g	Natriumchlorid (NaCl) ¹
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) ¹
0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) ¹
0,2 g	Kaliumchlorid (KCl) ¹
ad 1000 ml	Aqua dest.

pH-Wert mit 0,1M HCl¹ bzw. 0,1M NaOH¹ auf 7,2 eingestellt

Ficoll-Paque²

Heparinlösung (500 U/ml)

1 ml	Heparin-Natrium 20.000 ¹⁶
ad 40 ml	RPMI 1640 ¹⁰

Trypanblau-Lösung⁵

4.4.2 Durchführung

PBMCs wurden mittels zwei verschiedener Zentrifugationsverfahren gewonnen. Zur Herstellung von PBMC-Suspensionen mit einem geringen Gehalt an Thrombozyten wurde auf das Slow Speed Zentrifugationsverfahren zurückgegriffen. In allen anderen Fällen kam die Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation zum Einsatz.

4.4.2.1 Diskontinuierliche Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

5 ml PBS wurden mit 5 ml Hühnerblut in einem 15 ml Reagier-Röhrchen gemischt. In ein 50 ml Reagier-Röhrchen wurden 10 ml Ficoll² vorgelegt. Dieses wurde mittels einer Pipettierhilfe mit 10 ml Pipette vorsichtig mit den 10 ml Zellsuspension überschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen 12 min bei 20°C und 650 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die weißliche Interphase (=Leukozytensuspension) wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Nach dem Auffüllen mit PBS bis auf 15 ml wurde 10 min bei 4°C und 225 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS erneut resuspendiert, wieder auf 15 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 5 ml PBS aufgenommen und auf Eis gestellt. 100 µl der Suspension wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 900 µl PBS verdünnt. Daraufhin wurde die Zellzahl nach Trypanblaufärbung eines Aliquots mikroskopisch bestimmt. Nach Errechnung der Gesamtzellzahl, unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte, wurden die 5 ml Zellsuspension anschließend durch Zugabe einer entsprechenden Menge PBS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

4.4.2.2 Slow Speed Zentrifugation

Mit Hilfe der „Slow Speed“ Zentrifugation wurden PBMC mit niedrigem Thrombozytengehalt gewonnen. Dazu wurden 10 ml ungerinnbar gemachtes Vollblut bei Raumtemperatur 15 min bei 60 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die auf den Erythrozyten liegenden Leukozyten durch vorsichtiges Rühren mit einer Pasteurpipette im Plasma aufsuspendiert, aber gleichzeitig so wenig Erythrozyten wie möglich aufgewirbelt. Der Überstand mit den resuspendierten Leukozyten wurde vorsichtig in ein 15 ml Röhrchen überführt und das Röhrchen mit den Erythrozyten verworfen. Die Leukozytensuspension wurde, wie bei der Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation beschrieben (s. 4.4.2.1), zwei Mal mit PBS gewaschen und nach der

Zellzählung mit Trypanblau auf eine Konzentration von 1×10^7 lebende Zellen /ml eingestellt.

4.4.2.3 Zellzählung in der Modifizierten Zählkammer nach Neubauer

Die Gesamtzahl aufgereinigter lebender Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblaulösung vermischt. Mit der lebend/tot gefärbten Suspension wurde eine modifizierte Neubauer Zählkammer beschickt. Anschließend wurden die lebenden Zellen in den vier Gruppenquadraten ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte wurde dann die Konzentration lebender Zellen in der Ursprungssuspension errechnet.

4.5 Blutausstriche

4.5.1 Material

Objektträger, 76 x 26 mm, geschnitten, geputzt/ gebrauchsfertig¹²

Deckgläser, 32 x 24 mm, geschnitten⁹

Methanol, absolut, azetonfrei¹

4.5.2 Anfertigung

Um eine konstante Qualität zu gewährleisten, wurden alle Blutausstriche von derselben Person angefertigt. Diese hatte die Ausstrichtechnik vor den eigentlichen Experimenten soweit wie möglich standardisiert und so lange geübt, bis die Blutausstriche reproduzierbar ein makroskopisch einheitliches Erscheinungsbild und mikroskopisch eine ausreichend große Monolayer-Region mit nur vereinzelt zerstörten Leukozyten aufwiesen.

Beste Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Objektträger vor der Benutzung unter fließendem, destilliertem Wasser durch Hin- und Herreiben zwischen den Kuppen von Daumen und Zeigefinger von vorhandenem Papierabrieb befreit worden waren. Anschließend wurden die Objektträger mit weitgehend fusselfreiem Papier gereinigt und staubfrei bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die Anfertigung der Blutausstriche wurden Blutproben verwendet, die unmittelbar nach der Entnahme auf einen Taumel-Rollenmischer verbracht wurden. Das Blut-Röhrchen wurde vor dem Öffnen 25 mal invertiert. Dann wurden mit einer Pipette 5 µl Blut als Tropfen mittig, ca. 10 mm entfernt von dem gefrosteten Beschriftungsfeld, auf einen Objektträger aufgebracht. Als ebene und zugleich nicht

zu harte Unterlage für den Objektträger diene ein Schreibblock. Unmittelbar nach dem Aufbringen des Blutropfens wurde dieser vorsichtig mit einem langen, rechteckigen Deckglas ausgestrichen. Dazu wurde das Deckglas mit der kürzeren Kante links vom Tropfen in einem Winkel von 30-45° aufgesetzt und langsam an diesen herangeführt. Sobald sich der Tropfen aufgrund der Oberflächenspannung entlang der Kante des Deckglases ausgebreitet hatte, kurz bevor die beiden Ecken erreicht waren, wurde das Deckglas mit sanftem Druck in Richtung Objektträgerende geschoben und erst kurz vor diesem wieder abgehoben. Anschließend wurde der Ausstrich luftgetrocknet. Um den Vorgang zu beschleunigen wurde der Objektträger durch eine schüttelnde Bewegung im Handgelenk einem leichten Luftzug ausgesetzt. Nach Möglichkeit wurden von jeder Probe drei Ausstriche angefertigt. Zwei wurden zur Fixierung für einige Sekunden in reinem Methanol fixiert. Der Dritte blieb unfixiert. Ein fixierter und der nicht fixierte Ausstrich wurden zur mikroskopischen Untersuchung an Pendllab eingesandt. Unmittelbar nach dem Eintreffen der Proben wurden diese gefärbt. Der zweite fixierte Ausstrich verblieb als Rückstellmaterial am Heimatinstitut. Aufgrund der erfahrungsgemäß besseren Qualität der unfixierten Ausstriche wurden primär diese zur Beurteilung herangezogen.

4.5.3 Färbungen

4.5.3.1 Wright-Giemsa Färbung

Die Wright-Giemsa Färbungen wurden von Frau Dr. Helene Pendl (Pendllab) durchgeführt (Pendl 2005)

4.5.3.1.1 Material

Wright-Giemsa-Lösung

3,0 g	Wright Pulver ¹³
0,3 g	Giemsa Pulve ¹³
5,0 ml	Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃) ¹³
ad1000ml	absolutes Methanol (CH ₃ OH) (azetonfrei) ¹

Puffer pH 6.8 (Sørensen)

1	Puffertablette nach Weise ¹³
	Hauptkomponenten laut Hersteller:

Material und Methoden

0,47g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,47g KH_2PO_4

ad 1000 ml Aqua dest.

Entellan Neu¹³

4.5.3.1.2 Durchführung

Der zu färbende Objektträger wurde 3 Minuten mit Färbelösung bedeckt. Dann wurde die gleiche Menge Puffer pH 6.8 hinzugefügt. Vorsichtig wurden beide Flüssigkeiten vermischt, bis ein metallgrüner Schimmer auf der Oberfläche entstand. Nach weiteren 6 Minuten Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit abgekippt und der Objektträger anschließend 1 Minute mit Puffer bedeckt. Dann wurde der Puffer abgekippt und reichlich mit frischem Puffer nachgespült. Die Rückseite des Objektträgers wurde mit einem Tuch von den Farbresten gereinigt und der Objektträger in einem Ständer luftgetrocknet. Abschließend wurden die Objektträger mit Schnelleindeckmittel (Entellan Neu¹¹) sowie einem Deckgläschen eingedeckt.

4.5.3.2 Diff Quik Schnellfärbung

Zur schnellen Beurteilung wurden Blutaussstriche mit der Diff-Quik¹¹-Schnellfärbung gefärbt.

Der Objektträger wurde dazu jeweils 5 x eine Sekunde in die Lösungen Diff-Quik Fix, Diff-Quik I und Diff-Quik II getaucht. Zwischen den verschiedenen Lösungen wurde der Objektträger zum Abtropfen mehrfach kurz mit der unteren Kante auf ein saugfähiges Papier einer Laborpapierrolle aufgesetzt. Anschließend wurde der Objektträger nacheinander in zwei mit je 5 l destilliertem Wasser gefüllten Kunststoff-Gefäßen geschwenkt, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Bei den letzten Untersuchungen wurde die Diff-Quik Fix-Lösung durch reines Methanol ersetzt, um einer Zerstörung der Granula der Basophilen vorzubeugen.

4.5.4 Mikroskopische Untersuchung

4.5.4.1 Differentialblutbild

Es wurden folgende Zellpopulationen differenziert:

Thrombozyten

Leukozyten

Lymphozyten

Monozyten

Heterophile Granulozyten

Basophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten

Blasten

4.5.4.2 Schätzung absoluter Leukozyten- und Thrombozytenzahlen

Die Schätzungen der absoluten Zahlen der verschiedenen Leukozyten und der Thrombozyten wurden von Frau Dr. Helene Pendl (Pendllab) durchgeführt.

4.5.4.2.1 Verfahren nach Campbell modifiziert nach Pendl

Die absoluten Zahlen der verschiedenen Zellpopulationen wurden in einem Schätzverfahren durch die mikroskopische Beurteilung der Blutausstriche ermittelt. Dabei wurden entgegen dem Verfahren nach Campbell (Sack, Tarnok, and Rothe 2006; Nguyen, Diamond, and Braylan 2003; Radbruch 2007; Shapiro 2003) nicht nur fünf sondern nach dem von Pendl modifizierten Verfahren (Assendelft, Preston, and Rowan 2001; Nicholson et al. 1996) 20 Sichtfelder bei 100facher Vergrößerung (Öl-Immersion-Objektiv) ausgezählt. Es wurden ausschließlich Sichtfelder herangezogen in denen die Blutzellen als Monolayer vorlagen. Die Sichtfelder wurden stets so gewählt, dass der Blutausstrich einmal komplett von oben nach unten „durchquert“ wurde. Ausgehend von dem Verfahren nach Campbell wurde die Zellzahl mit folgendem Verfahren berechnet:

$$\text{Zellzahl/mm}^3 = \frac{\text{ausgezählte Zellen in 20 Ölimmersions-Feldern} \times 5 \times 3500 \times \text{gemessener Hkt (in \%)}}{20 \times 45\%}$$

Die Hämatokritwerte sind nach dem Verfahren nach Campbell miteinzurechnen, wenn sie außerhalb der angegebenen „normal range“ von 35 – 55% liegen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwar nicht die Hämatokritwerte der einzelnen Proben bestimmt, erfahrungsgemäß lagen die Werte bei den Versuchs-Hühnern von denen

die Blutproben stammten aber stets im Bereich von 25 - 35%. Deshalb wurde für alle Proben der Wert 30% in die Formel eingesetzt.

$$\text{Zellzahl/mm}^3 = \frac{\text{ausgezählte Zellen in 20 Ölimmersions-Feldern} \times 5 \times 3500 \times 30\%}{20 \times 45\%}$$

damit ergab sich folgende Formel:

$$\text{Zellzahl/mm}^3 = \frac{\text{ausgezählte Zellen in 20 Ölimmersions-Feldern} \times 5 \times 3500 \times 0,67}{20}$$

4.6 Durchflusszytometrie

Die Grundprinzipien der Durchflusszytometrie wurden bereits im Kapitel „Literatur“ dargestellt (s. 3.9). Da es sich bei der Durchflusszytometrie um eine etablierte Standardtechnik handelt, sei an dieser Stelle auf die Fachliteratur verwiesen (Moritomo et al. 2002; Uchiyama et al. 2005).

Hinsichtlich der eingesetzten Fluorochrome wurde sofern möglich auf die vom Hersteller der benutzten Durchflusszytometer empfohlenen Standardfarbstoffe FITC, RPE und PerCP zurückgegriffen.

4.6.1 Durchflusszytometer

Zum Einsatz kamen Geräte der Typen FACScan und FACScalibur.

4.6.2 Antikörper

4.6.2.1 Direktkonjugate

Zielantigen	Klon	Fluorochrom	Isotyp	Gefärbte Zellen	Referenz	Verdünnung	erhältlich bei (siehe Anhang)
CD45	16-6	FITC	IgG2ak	Leukozyten, Thrombozyten	(Viertboeck and Gobel, 2007)	1/40	18
CD45	16-6	PerCP	IgG2ak	Leukozyten, Thrombozyten	(Viertboeck and Gobel, 2007)	1/6400	Eigenkonjugation
CD45	LT40	SPRD	IgMk	Leukozyten, Thrombozyten	(Paramithiotis et al., 1991)	1/160	3
CD41/CD61	11C3	RPE	IgG1k	Thrombozyten	(Lacoste-Eleaume et al., 1994, Corbel, C. et al., 2002)	1/40	18
unbekannt	K1	RPE	IgG2ak	Thrombozyten, Monozyten	(Kaspers et al., 1993)	1/6400	Eigenkonjugation
unbekannt	KUL01	RPE	IgG1k	Monozyten	(Mast et al., 1998)	1/1600	21
CD4	CT4	FITC	IgG1k	T-Helferzellen	(Chan et al., 1988)	1/5120	3
CD4	CT4	RPE	IgG1k	T-Helferzellen	(Chan et al., 1988)	1/10240	3
CD8α	3-298	FITC	IgG2ak	zytotox. T-Lymphozyten	(Li et al., 1999)	1/10	Eigenkonjugation
CD8α	CT8	FITC	IgG1k	zytotox. T-Lymphozyten	(Chan et al., 1988)	1/2560	3
CD8α	CT8	RPE	IgG1k	zytotox. T-Lymphozyten	(Chan et al., 1988)	1/20480	3
CD8β	EP42	FITC	IgG2ak	zytotox. T-Lymphozyten	(Tregaskes et al., 1995)	1/100	21
TCRγδ	TCR1	FITC	IgG1k	γδ-T-Lymphozyten	(Chen et al., 1988, Sowder et al. 1988)	1/640	21
TCRαβ(Vβ1)	TCR2	FITC	IgG1k	T-Lymphozyten	(Chen, C.H. et al. 1988)	1/160	21
TCRαβ(Vβ2)	TCR3	FITC	IgG1k	T-Lymphozyten	(Chen, C.H. et al. 1989)	1/320	21
CD3	CT3	FITC	IgG1k	T-Lymphozyten	(Chen, C.H. et al. 1986, Lathi, J.M. et al. 1988)	1/160	21
CD5	2-191	FITC	IgG1k	Lymphozyten	(Koskinen et al. 1998)	1/640	3
BU1(chB6)	AV20	FITC	IgG1k	B-Lymphozyten	(Rothwell et al., 1996 Tregaskes, C.A. 1996)	1/400	21
BU1(chB6)	AV20	RPE	IgG1k	B-Lymphozyten	(Rothwell et al., 1996 Tregaskes, C.A. 1996)	1/800	21
L-Kette	2G1	FITC	IgG1k	B-Lymphozyten		1/10	Eigenkonjugation

Tab. 1:

Tabelle der eingesetzten Direktkonjugate

4.6.2.2 Primäre Antikörper

Als primäre, nicht konjugierte Antikörper kamen eine Auswahl der unter 4.6.2.1 genannten Klone zum Einsatz. Es handelte sich dabei allerdings um Zellkulturüberstände, die unverdünnt verwendet wurden.

4.6.2.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Ziege- α -Maus-IgG-FITC	1/50
Ziege- α -Maus-IgG1-FITC	1/50
Ziege- α -Maus-IgG2a-FITC	1/50
Ziege- α -Maus-IgG-PE	1/300
Ziege- α -Maus-IgG1-PE	1/300
Ziege- α -Maus-IgG2a-PE	1/300
Ziege- α -Maus-IgG-Alexa Fluor 647-RPE	1/100

Tab. 2:

Tabelle der eingesetzten sekundären Antikörper

4.6.2.4 Konjugationen

4.6.2.5 FITC-Konjugation

4.6.2.5.1 Material

Boratpuffer A pH 8,4

30,92 g Borsäure (H_3BO_3)¹
 47,68 g Na-Tetraborat/Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$)¹
 21,92 Natriumchlorid (NaCl)¹
 ad 5000 ml Aqua dest.

pH-Wert mit 0,1 M NaOH¹ auf 8,4 eingestellt.

Lagerung bei 4 °C

Boratpuffer B pH 9,5

30,915 g Borsäure (H_3BO_3)¹

Material und Methoden

47,675 g Na-Tetraborat/Borax($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$)¹

21,915 Natriumchlorid (NaCl)¹

ad 5000 ml Aqua dest.

pH-Wert mit NaOH (40%)¹ auf 9,5 eingestellt.

Lagerung bei 4 °C

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2

40,0 g Natriumchlorid (NaCl)¹

1,0 g Kaliumchlorid (KCl)¹

7,25 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)¹

1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)¹

ad 5000 ml Aqua dest.

pH-Wert mit 0,1M NaOH ¹ bzw. 0,1 M HCl ¹ auf 7,2 eingestellt.

Lagerung bei 4 °C

Dimethylformamid (DMF) ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$)²⁰

Fluorescein-Isothiocyant (FITC) ($(\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S})$)²⁰

Dialyseschlauch (aus regenerierter Cellulose, MWCO 14 000 Da)¹⁷

Antikörper (in einer Konzentration von 4 mg/mL; falls erforderlich einengen)

4.6.2.6 Aufkonzentrierungen

In den Fällen in denen Antikörperlösungen konzentriert werden mussten, erfolgte dies mit der Centricon YM-30¹⁴ Filtrationseinheit gemäß den Herstellerangaben.

4.6.2.6.1 Durchführung

Tag 1:

2 ml AK Lösung (4mg/ml) wurden zu je 1,0 ml auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und 10 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und je 1 ml in einen vorher für 5 min in Puffer A eingelegten Dialyseschlauch eingefüllt. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit Knoten und Klemmen verschlossen und in einen Behälter mit 5 l Boratpuffer A gelegt. Mittels eines Rührfisches wurde der Puffer über Nacht bei 4 °C umgewälzt.

Tag 2:

Am nächsten Tag wurden die Dialyseschläuche in einen Behälter mit 5 l Boratpuffer B gelegt und 1 h lang dialysiert. Anschließend wurde die AK-Lösung aus den Dialyseschläuchen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration in einem Photometer bei 280 nm gemessen. Dann wurde die Antikörperkonzentration durch Zugabe von Boratpuffer B auf 1,0 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde das FITC in einer Konzentration von 2 mg/ml in DMF aufgelöst. 10 Teilen der Antikörperlösung wurde ein Teil FITC-Lösung zugegeben. In einem mit Aluminiumfolie umwickelten 15 ml Röhrchen wurde das Reaktionsgemisch für 1 h mit einem Rührfisch bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Lösung erneut in Dialyseschläuche pipettiert und über Nacht gegen 5 l PBS dialysiert.

Tag 3:

Am folgenden Tag wurde die AK-Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut 10 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und seine Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Die Konjugate wurden anschließend geschützt vor Licht bei 4 °C gelagert.

4.6.2.6.2 RPE-Konjugation

Die RPE-Konjugation wurde mit dem PJ31K PhycoLink R-Phycoerythrin Conjugation Kit¹⁵ nach den Herstellerangaben durchgeführt.

4.6.2.6.3 PerCP-Konjugation

Die PerCP-Konjugation wurde mit dem PJ40K PhycoLink Peridinin-chlorophyll-protein complex (PerCP) Conjugation Kit¹⁵ nach den Herstellerangaben durchgeführt. Das Fluorochrom PerCP (Peridinin-chlorophyll-protein complex) ist äußerst lichtempfindlich. Deshalb wurde die direkte Lichteinstrahlung beim Umgang mit dem Farbstoff auf ein Minimum reduziert. Es wurde weitgehend vermieden, dass direktes Tageslicht oder Licht von der Deckenbeleuchtung in geöffnete Röhrchen traf, in denen sich PerCP befand. Gefäße die PerCP beinhalteten, wurden schnellstmöglich wieder verschlossen und die Umgebung so weit wie möglich abgedunkelt. Das Konjugat wurde in einem ambrafarbenen Reaktionsgefäß (1,5 ml Safe-Lock Eppendorf Tube, mit stark reduzierter Lichtdurchlässigkeit) bei 4 °C aufbewahrt.

4.6.2.7 Aufreinigung der Konjugate

Die Aufreinigung der RPE- und PerCP-Konjugate wurde mit dem KPK80 PhycoLink Conjugate Purification Kit¹⁵ nach den Herstellerangaben durchgeführt.

4.6.3 Färbungen

4.6.3.1 Periphere Blutleukozyten

4.6.3.2 Vollblut

4.6.3.2.1 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3))-Färbung

4.6.3.2.1.1 Material

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 10mM HEPES pH 7,35

25,0 ml HBSS 10x (-Ca²⁺, -Mg²⁺)¹⁰

2,5 ml HEPES¹⁰

ad 250 ml Aqua bidest.

pH-Wert mit 0,1M NaOH¹ auf 7,35 eingestellt

3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3))-Stammlösung (500 µg/ml)

5,0 mg 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3))²⁰

10 ml Ethanol (CH₃CH₂OH) (99,8%, p.a.)¹

4.6.3.2.1.2 Durchführung

Zur Färbung wurden 40 µl DiOC₅(3)-Stammlösung (500 µg/ml) in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden 1950 µl HBSS und 10 µl Blut zugegeben. Die Probe wurde dann vorsichtig gevortex und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

4.6.3.2.2 Kombination von 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3)) mit monoklonalen Antikörpern

Bei der Kombination von DiOC₅(3) mit monoklonalen Antikörpern wurde zunächst mit den Antikörpern gefärbt wie unter 4.6.5.3 beschrieben. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen allerdings nicht in Fluopuffer resuspendiert, sondern in 300 µl. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in HBSS mit 10 µg/ml (DiOC₅(3)) resuspendiert.

4.6.3.3 Durchflusszytometrische PBMC-Färbung mittels monoklonaler Antikörper

4.6.3.3.1 Material

PBS (s. 4.6.2.5.1)

Fluo-Puffer

5 g Bovines Serum Albumin (BSA)¹

50 mg Natrium-Azid (NaN₃)¹

ad 500 ml PBS

Lagerung bei 4 °C

FACS-Puffer

100 mg NaN₃¹

ad 1000 ml PBS

Lagerung bei RT

Paraformaldehyd (PFA) 4%

20 g Paraformaldehyd¹

ad 450 ml Aqua bidest.

im Wasserbad bei 60 °C ca. 1 h rühren, dann einige Tropfen 0,1M NaOH¹ zugeben um das restliche PFA in Lösung zu bringen, 50 ml 10xPBS zugeben, Lagerung: 4 °C

4.6.3.3.2 Einfachfärbung von PBMC

Die im Folgenden genannten Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Kavität der zum Färben benutzten 96-Loch-Rundboden-Platten. Zur Verdünnung von Antikörpern wurde Fluo-Puffer eingesetzt. Die Inkubationsschritte fanden auf Eis und im Dunkeln statt.

1x10⁶ Zellen/Kavität wurden auf eine 96-Loch-Platte transferiert und durch Zentrifugation (1min bei 716 x g) pelletiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µl des primären Antikörpers resuspendiert und für 20 min inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen durch Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer und erneuter Zentrifugation, wurden die Proben für 20 min in 35 µl der sekundären Antikörperlösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer, Zentrifugation) wurden die

Zellen zur Messung in 300 µl Fluo-Puffer aufgenommen und in geeignete Probenröhrchen überführt.

4.6.3.3.3 Doppelfärbung

Für einige Doppelfärbungen, bei denen die betreffenden primären Antikörper unterschiedliche Isotypen aufweisen, wurde die Färbung mit isotypspezifischen Sekundärantikörpern durchgeführt (z.B. AV20 (IgG1) vs. 16-6(IgG2a)). Hierzu wurden die Zellen zunächst für 25 min gleichzeitig mit je 35 µl beider Primärantikörper inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Färbung mit 35 µl einer Mischung der entsprechenden isotypspezifischen Sekundärantikörper z.B. α -Maus-IgG1-FITC + α -Maus-IgG2a-RPE in den angegebenen Verdünnungen.

4.6.4 Fixierung

Konnten die Proben nicht sofort im Anschluss an die Färbung gemessen werden und war eine Lebend/Tot Färbung nicht nötig, wurden sie in 1% PFA fixiert. Dazu wurden 100 µl PFA 4% in die Probenröhrchen vorgelegt und die in 300 µl Fluo-Puffer aufgenommene Probe dazugegeben. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

4.6.5 Entwicklung der Single-Tube No-Wash-Färbung von Blut

Die Vollblutfärbungen wurden zunächst nach den für die PBMC-Färbung etablierten Protokollen durchgeführt. Im Verlauf des Projektes wurde die Technik aber schrittweise modifiziert.

Die folgenden Färbetechniken stellen Variationen der üblicherweise bei der PBMC-Färbung eingesetzten Technik zur Untersuchung von Vollblut dar (s. 4.6.3.3). Neben dem mit Heparin oder EDTA ungerinnbar gemachten Blut kamen die gleichen Materialien zum Einsatz (s. 4.6.3.3.1).

4.6.5.1 α -Huhn-Direktkonjugat mit Waschschrift

Die Blutprobe wurde zunächst 1/10 in Fluopuffer verdünnt und dann 10 µl dieser Vormischung in die Kavität einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Das weitere Vorgehen war ähnlich wie bei der PBMC-Färbung (s. 4.6.3.3). Durch Zentrifugation (1min bei 716 x g) wurden die Zellen pelletiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µl des Antikörpers resuspendiert und für 20 min inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen durch Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen

zur Messung in 300 µl Fluo-Puffer aufgenommen und in geeignete Probenröhrchen überführt.

4.6.5.2 α -Huhn-Direktkonjugat ohne Waschschrift

Das Vorgehen entspricht im Wesentlichen dem bei der Färbung mit Waschschrift (s. 4.6.5.1). Es wurde lediglich auf das Pelletieren und den Waschschrift verzichtet. Stattdessen wurden nach der Inkubation 240 µl Fluo-Puffer zugegeben, bevor die Zellen resuspendiert und in Probenröhrchen überführt wurden.

4.6.5.3 primärer mAK + sekundäres Ziege- α -Maus-IgG-Fluorochrom-Konjugat mit Waschsritten

Das Vorgehen entspricht im Wesentlichen dem unter 4.6.5.1 beschriebenen. Allerdings war wie unter 4.6.3.3.2 ein weiterer Inkubations- bzw. Waschschrift erforderlich. Die Zellpellets wurden also in je 50 µl des primären Antikörpers resuspendiert und für 20 min inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen durch Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer und erneuter Zentrifugation, wurden die Proben für 20 min in 35 µl der sekundären Antikörperlösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (Zugabe von 150 µl Fluo-Puffer, Zentrifugation) wurden die Zellen zur Messung in 300 µl Fluo-Puffer aufgenommen und in die Probenröhrchen überführt.

4.6.5.4 primärer mAK + sekundäres Ziege- α -Maus-IgG-Fluorochrom-Konjugat ohne Waschsritte

Das Vorgehen erfolgt im Wesentlichen wie unter 4.6.5.3 beschrieben. Allerdings wurde auf das Pelletieren und die Waschsritte verzichtet. Nach Zugabe von 50 µl des primären Antikörpers wurden die Proben resuspendiert und für 20 min inkubiert. Anschließend wurden 35 µl der sekundären Antikörperlösung zugegeben und die Zellen nach erneuter Resuspension für weitere 20 min inkubiert. Dann wurden 205 µl Fluopuffer zugegeben, wieder resuspendiert und die Proben in die Probenröhrchen überführt.

4.6.6 Entwicklung der Multi-Colour-Single Tube-No-Wash-Färbung von Blut

Durch den Einsatz von Direktkonjugaten konnte zunehmend auf sekundäre Antikörper verzichtet werden. Für jeden eingesetzten Antikörper wurde in einem Titrationsexperiment die optimale Konzentration bestimmt. Auf diese Weise wurde

das unspezifische Hintergrundrauschen so weit reduziert, dass schließlich ganz auf Waschschriffe verzichtet werden konnte.

Üblicherweise wurde für eine Färbung 1 µl Blut eingesetzt. In den meisten Fällen wurde das Blut dabei zunächst 1/10 in Fluopuffer verdünnt und dann 10 µl dieser Vormischung in eine Kavität vorgelegt. Alternativ wurde eine 1/50 Verdünnung eingesetzt, die die Zugabe von 50 µl vorverdünnter Probe ermöglichte.

In der Regel wurden die direktkonjugierten Antikörper bereits als Vormischung zur verdünnten Blutprobe hinzugegeben. Dazu wurden gleiche Volumina der verschiedenen AK-Stammlösungen in ein geeignetes Reaktionsgefäß pipettiert. Wenn weniger als sieben Antikörper enthalten waren wurde eine der Differenz entsprechende Menge Fluopuffer zugegeben. Anschließend wurde die „AK-Mix“-Mischung gevortext, zentrifugiert und auf Eis, sowie vor Licht geschützt bis zur Färbung aufbewahrt.

Bei Experimenten in denen viele verschiedene Antikörper-Kombinationen getestet wurden, mussten die Antikörper dagegen einzeln zur Probe gegeben werden. Üblicherweise wurde dann von jeder Antikörperlösung ein Volumen von 7,1 µl hinzupipettiert. Insgesamt wurden stets 50 µl Färbelösung zur Probe gegeben. Wurden weniger als 7 verschiedene Antikörper zugegeben, so wurde die Differenz zu 50 µl mit Fluopuffer ergänzt.

Bei quantitativ ausgewerteten Experimenten wurden die Färbungen nicht mehr in 96-Loch-Rundboden-Platten aus Polystyrol durchgeführt. Um die Verluste durch Adhärenz von Zellen (v.a. Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten) zu verringern, wurde stattdessen in Polypropylenröhrchen gefärbt. Nach Implementierung der aus Polystyrol bestehenden TruCOUNT Tubes⁴ zur absoluten Quantifizierung wurde die Adhärenz durch den Einsatz Transfix-fixierter Blutproben minimiert.

4.6.7 Single-Tube No-Wash-Färbung fixierter Blutproben mit absoluter Quantifizierung von Thrombozyten und Leukozyten

4.6.7.1 Grundsätzliche Hinweise

Um später bei der durchflusszytometrischen Blutuntersuchung zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, wurden bereits die Pipettivorgänge im Rahmen der Probenfixierung mit äußerster Sorgfalt durchgeführt. Aufgrund der höheren Genauigkeit wurde bei entscheidenden Schritten die Technik des “reverse pipetting” eingesetzt.

4.6.7.2 Fixierung der Blutproben mit Transfix

Das Blutentnahme-Röhrchen (Vacutainer oder Monovette) mit der darin enthaltenen Blutprobe wurde 25 mal vorsichtig invertiert, um die Zellen vollständig zu resuspendieren. Dann wurden 400 µl EDTA-Blut durch reverse pipetting aus dem Blutentnahme-Röhrchen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden 80 µl Fixierungslösung durch reverse pipetting zu dem Blut in das 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, ohne dabei mit der Pipettenspitze das vorgelegte Blut zu berühren. Zuletzt wurde das Reaktionsgefäß sorgfältig verschlossen, 25 mal invertiert und auf dem Schüttler gemischt, um eine homogene Suspension aus Blut und Fixierungslösung herzustellen.

4.6.7.3 Färbung im Single-Tube No-Wash-Verfahren

4.6.7.3.1 Vorbereitungen für die Färbung

Um einen zügigen Ablauf der Färbung zu ermöglichen, wurden alle vorbereitenden Schritte wie z.B. Berechnung und Herstellung der Verdünnungen, Beschriftung von Gefäßen etc. vor Beginn der Probenverarbeitung durchgeführt.

4.6.7.3.2 Material

4.6.7.3.2.1 Fluopuffer

Um ausgefallenes bei durchflusszytometrischen Langzeitmessungen störendes BSA zu entfernen, wurde der für die Färbungen eingesetzte Fluopuffer durch Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm¹⁸ sterilfiltriert, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Kühlschrank aufbewahrt.

4.6.7.3.2.2 Antikörper-Lösungen

Vor Beginn der Färbung wurde eine, die verschiedenen direktkonjugierten, monoklonalen Antikörper enthaltende, Lösung („AK-Mix“) frisch hergestellt. Um jeden Antikörper in der optimalen Konzentration einsetzen zu können und zugleich möglichst wenig Reagenzien zu verschwenden, wurde zunächst von jedem Antikörper eine vorverdünnte Stammlösung hergestellt. Aus gleichen Anteilen aller Stammlösungen wurde dann erst die zur Färbung eingesetzte „AK-Mix“-Lösung angemischt. Die Antikörper-Konzentrationen der Stammlösungen und der „AK-Mix“-Lösung wurden so berechnet, dass bei der späteren Färbung in dem Gemisch aus

Probe und „AK-Mix“-Lösung die AK-Konzentrationen den in Titrationsexperimenten ermittelten optimalen Konzentrationen entsprachen.

4.6.7.3.2.3 TruCOUNT Tubes

Die TruCOUNT Tubes⁴ wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

4.6.7.3.3 Berechnung und Herstellung der mAK-Stammlösungen

Zur Vereinfachung der Berechnung der AK-Stammlösungen wurde mit MS Excel eine Tabelle erstellt, mit deren Hilfe die Berechnungen für die Herstellung der mAK-Stammlösungen automatisiert durchgeführt werden konnten.

Für jeden Antikörper musste vorher die optimale Konzentration eingegeben werden. Die anzumischenden Stammlösungen wurden dann so berechnet, dass bei einer Verdünnung von 1/7 bei der Herstellung der „AK-Mix“-Lösung und einer anschließenden weiteren Verdünnung der Ausgangskonzentration von 2/7 bei der Mischung mit der verdünnten Blutprobe die Endkonzentration der Antikörper den in Titrationsexperimenten ermittelten optimalen Konzentrationen entsprachen. Die Exceltabelle wurde durch voreingegebene Formeln so konfiguriert, dass zur Vermeidung von Pipettierungenauigkeiten keine kleineren Volumina als 1 µl pipettiert werden mussten und stets etwas mehr als das erforderliche Volumen angemischt wurde, um geringe Verluste, wie sie durch die Adhäsion von Flüssigkeiten an die Oberflächen der Reaktionsgefäße entstehen, auszugleichen.

4.6.7.3.4 Verdünnung der Blutprobe

Das die fixierte Blutprobe enthaltende Reaktionsgefäß wurde 25 mal vorsichtig invertiert, um die Blutzellen zu resuspendieren. Sofern die fixierten Blutproben nicht kontinuierlich auf einem Taumel-Rollenmischer gelagert worden waren, wurden die Zellpellets mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl fixiertes EDTA-Blut durch reverse pipetting in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Herstellung einer 1/50-Verdünnung wurden 980 µl sterilfiltrierter Fluopuffer (Raumtemperatur) durch reverse pipetting ohne Eintauchen der Pipettenspitze zu dem Blut in das 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde 10 mal invertiert, um eine vollständige Durchmischung von Blut und Fluopuffer zu gewährleisten.

4.6.7.3.5 Durchführung der Färbung

Die benötigte Menge an TruCOUNT Tubes wurde unmittelbar vor der Färbung aus dem bei Raumtemperatur gelagerten Beutel entnommen. Die auf dem Beutel angegebene Chargennummer („LOT“) und die vom Hersteller angegebene Zahl der beads „Bead Count“ wurde für die spätere Auswertung notiert. Die TruCOUNT Tubes wurden so gekennzeichnet, dass eine eindeutige Identifizierung der Probe möglich war. Dann wurden 20 µl des „AK-Mix“ knapp oberhalb des Metallplättchens an die Seitenwand des TruCOUNT Tube pipettiert, ohne das bead-Kügelchen zu berühren. Mittels Reverse Pipetting wurden 50 µl der in Fluopuffer verdünnten Blutprobe ebenfalls oberhalb des Metallplättchens an die gegenüberliegende Seitenwand des TruCOUNT Tube pipettiert, ohne das bead-Kügelchen oder den bereits zugegebenen AK-Mix-Tropfen zu berühren. Anschließend wurde das TruCOUNT Tube 3 mal eine Sekunde vorsichtig gevortext. Die Inkubation erfolgte für eine Dauer von 45 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Dann wurden 300 µl Fluopuffer (RT) zugegeben und das TruCOUNT Tube in Eis gesteckt. Der Eisbehälter wurde abgedeckt, um die Proben bis zur Messung gegen Lichteinfall zu schützen.

4.6.7.3.6 Verzicht auf Isotypenkontrollen

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Gatingstrategien zur Leukozytendifferenzierung, sind vergleichbar der Vorgehensweise beim T-gating (kombinierte 3-Farbdarstellung der Lymphozyten mittels α CD3, α CD4 und α CD8) und beim CD45/SSC-gating. Da verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, dass bei derartigen Protokollen keine Isotypenkontrollen erforderlich sind, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, konnte in der vorliegenden Arbeit weitgehend auf Isotypenkontrollen verzichtet werden (Burgess and Davison 1999).

4.7 Messung von Hühnerblutproben am FACScan/FACScalibur

4.7.1 Geräteeinstellungen

Die geeigneten Einstellungen wurden in ersten Testfärbungen und mit Hilfe von Kontrollen, in denen ein oder mehrere Antikörper des vollständigen „AK-Mix“ fehlten, ermittelt. Für die späteren Experimente wurden die Geräteeinstellungen dieser Messreihe wieder geladen. Vor jeder Messreihe erfolgte eine Überprüfung und ggf. eine Anpassung der Einstellungen an einer zusätzlich zu den eigentlichen Proben gefärbten Kontrolle.

4.7.2 Erstellung eines Messblattes

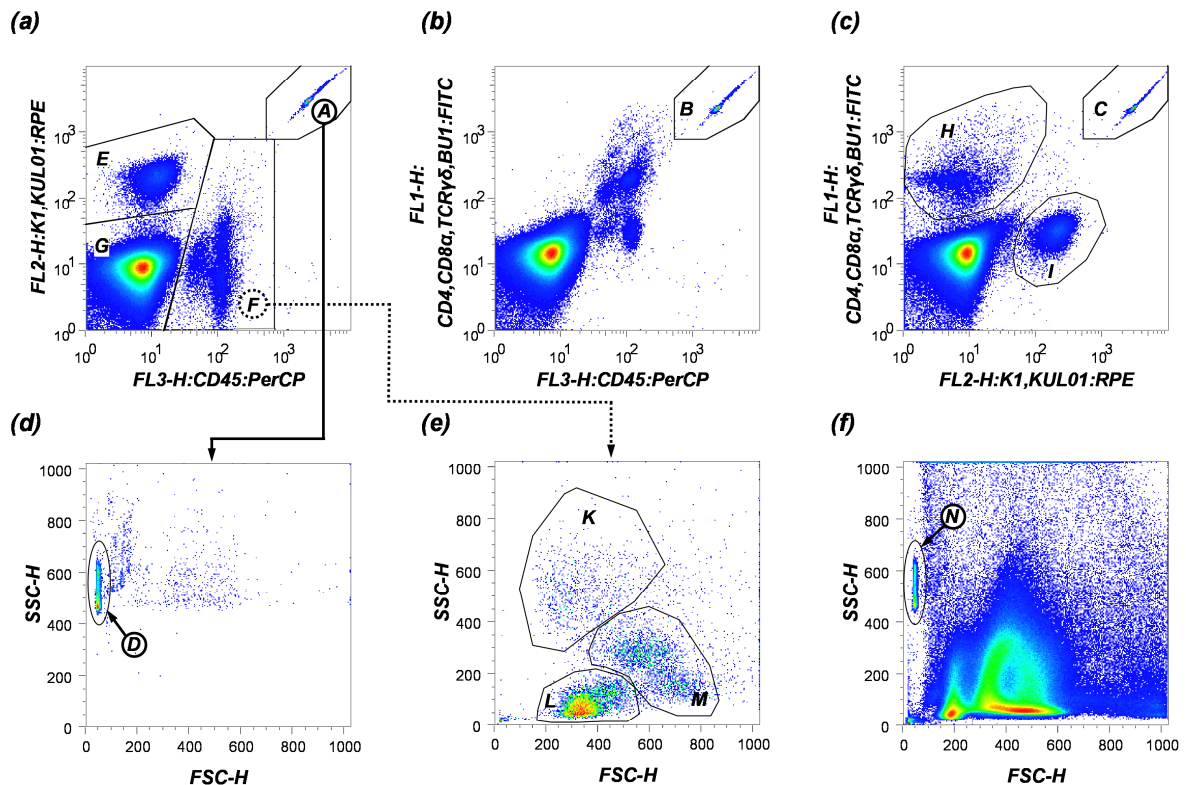


Abb. 3:
Messblatt mit plots zur Kontrolle der durchflusszytometrischen Messung von Blutproben

An dem Macintosh Computer mit dem auch das Durchflusszytometer bedient wurde, wurde mit CellQuestPro ein Messblatt erstellt, das folgende ungegatede dotplot-Darstellungen beinhaltet:

FL3 vs FL2 (Abb. 3a)

FL3 vs FL1 (Abb. 3b)

FL2 vs. FL1 (Abb. 3c)

FSC vs SSC (Abb. 3f)

Zudem wurden zwei dotplot-Darstellungen hinzugefügt, in denen sich bei der Messung jeweils ein gate anzeigen ließ:

FSC vs SSC (Abb. 3d)

FSC vs SSC (Abb. 3e)

Vor der Messung wurde der Threshold für FSC auf 0 eingestellt. Dies war aufgrund der geringen Größe der TruCOUNT beads zwingend erforderlich. Beim Messen einer Testfärbung wurden die Einstellungen optimiert. Bei der Festlegung der Einstellungen orientierte man sich zunächst an den beads. Sie sollten in FL3-H vs

FL2-H (Abb. 3 a), FL3-H vs FL1-H (Abb. 3 b) und FL2-H vs. FL1-H (Abb. 3c) stets innerhalb des Fensters in der rechten oberen Ecke als Population A, B bzw. C zu liegen kommen. In FL3-H vs FL2-H (Abb. 3a) sollten die deutlich voneinander abgrenzbaren Populationen E, F und G erkennbar werden; in FL2-H vs. FL1-H (Abb. 3 c) die Populationen H und I. In FL3 vs FL2 (Abb. 3a) wurde je ein gate um die Populationen A und F gelegt und diese wiederum jeweils in einer eigenen FSC vs SSC dotplot-Darstellung (Abb. 3d) und FSC vs SSC (Abb. 3e) angezeigt. In FSC vs SSC (Abb. 3d) sollten die beads als Population D etwa in dem Bereich zwischen 400 und 700 SSC und um 50 FSC liegen. In der Regel waren die beads auch in FSC vs SSC (Abb. 3f) als Population N in diesem Bereich erkennbar. Die Population F sollte in FSC vs SSC (Abb. 3e) in die Teilpopulationen L, M und K zerfallen. Es wurde darauf geachtet, dass die Population K vollständig innerhalb des plots zu liegen kam. Gleiches galt für die Population M. Die Zählrate (Summe aller Ereignisse) sollte etwa 2.000 – 3.000 events/s betragen. Idealerweise sollte dies bei Einstellung der Durchflussgeschwindigkeit low (FACScan) oder medium (FACScalibur) der Fall sein. Die Einstellungen des Durchflusszytometers wurden so gewählt, dass die Messungen nach dem Erreichen eines definierten Wertes von (5.000 bis 15.000) events in gate A (Beads) beendet wurden. Als zweiter alternativer Parameter zur Beendigung der Messung wurde eine Zeit zwischen 4 und 5 min eingegeben.

4.7.3 Besonderheiten bei der Messung

4.7.3.1 Absolute Quantifizierung der Leukozyten

Zu Beginn der Messreihe wurde das Durchflusszytometer auf den Modus „run“ geschaltet. Dann wurde das Röhrchen in den Haltemechanismus des Durchflusszytometers eingespannt und erst nach 5 Sekunden, wenn sich die Flussrate stabilisiert hatte, mit der Messung begonnen. Zur Kontrolle wurde dazu das Fenster „cytometer status“ angezeigt und beobachtet, wie sich nach dem Einspannen des Röhrchens der Wert „Sample Voltage“ änderte. Sobald sich der Wert in der Gegend zwischen 5,6 bis 6,5 stabilisiert hatte, wurde die Messung gestartet. Das Durchflusszytometer wurde während der gesamten Messreihe im Modus „run“ belassen, um Kreuzkontamination und Verdünnung der Proben zu minimieren.

4.7.3.2 Verarbeitung der generierten Daten

Die zunächst auf dem zur Steuerung des Durchflusszytometers eingesetzten Macintosh Computer über die Software CellQuestPro gespeicherten .fcs-files wurden auf einen PC übertragen. Dort wurden die Messdaten mit Hilfe des Programmes FlowJo, Tree Star ausgewertet. Um für den Druck geeignete Abbildungen zu erhalten, wurden die im „layout editor“ von FlowJo erstellten Abbildungen als .emf-Dateien gespeichert. Diese wurden dann in MS Powerpoint graphisch bearbeitet. Mit Hilfe von Gimp2.2 erfolgte die Umwandlung in das .png-Format. Für die statistische Auswertung wurden die Daten aus FlowJo in MS Excel importiert und dort weiterverarbeitet. Die Comparison Plots und Difference Plots wurden mit SPSS generiert.

4.7.4 Beads

Im Laufe der Entwicklung des „Single-Tube No-Wash-Färbung fixierter Blutproben mit absoluter Quantifizierung von Thrombozyten und Leukozyten“ wurden folgende beads zur absoluten Quantifizierung getestet:

FluoSpheres¹⁰

Caltag Counting beads¹⁰

FlowCount beads³

TruCOUNT beads⁴

Die absoluten Zellzahlen wurden nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Absolute Zellzahl / } \mu\text{l (Blut)} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Beads}} \times \frac{\text{Gesamtzahl Beads / Röhrchen}}{\text{eingesetztes Blutvolumen (}\mu\text{l)}}$$

4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der SPSS Software für Windows. Die Daten wurden mittels Wilcoxon-Test und Bland-Altman plots ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Membranfärbung mit 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3))

Die Färbung von Blut mittels 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3)) lässt sich sehr einfach durchführen. Wenn auf diesem Wege tatsächlich eine zuverlässige Identifizierung der Leukozyten und Thrombozyten gelingen würde, könnte möglicherweise auf aufwändigere Techniken wie die Färbung mittels monoklonaler Antikörper verzichtet werden. Zudem wäre die Technik möglicherweise bei vielen oder sogar allen Vogelspezies einsetzbar.

5.1.1 Huhn

Die in der Literatur beschriebene Färbung von Vogelblut mittels 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3)) wurde auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Zunächst wurde dafür Hühnerblut gemäß des von den Erstbeschreibern publizierten Protokolls mit DiOC₅(3) gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen (Assendelft, Preston, and Rowan 2001) (s. 4.6.3.2.1.) Die graphischen Auswertungen der eigenen Messungen gleichen in allen wesentlichen Kriterien denen der Erstbeschreiber der Technik.

In der zweidimensionalen Darstellung von linearer Fluoreszenz FL1-H und SSC-H, lassen sich die von den Autoren als Thrombozyten (A), Lymphozyten (B), Monozyten (C) und Heterophile und Eosinophile Granulozyten (D) identifizierten Populationen erkennen (Abb. 4). Die Populationen von Lymphozyten und Thrombozyten sind in der „PseudoColour“-Darstellung deutlich sichtbar, überschneiden sich jedoch selbst nach sorgfältigster Justierung der Einstellungen des Durchflusszytometers.

Ergebnisse

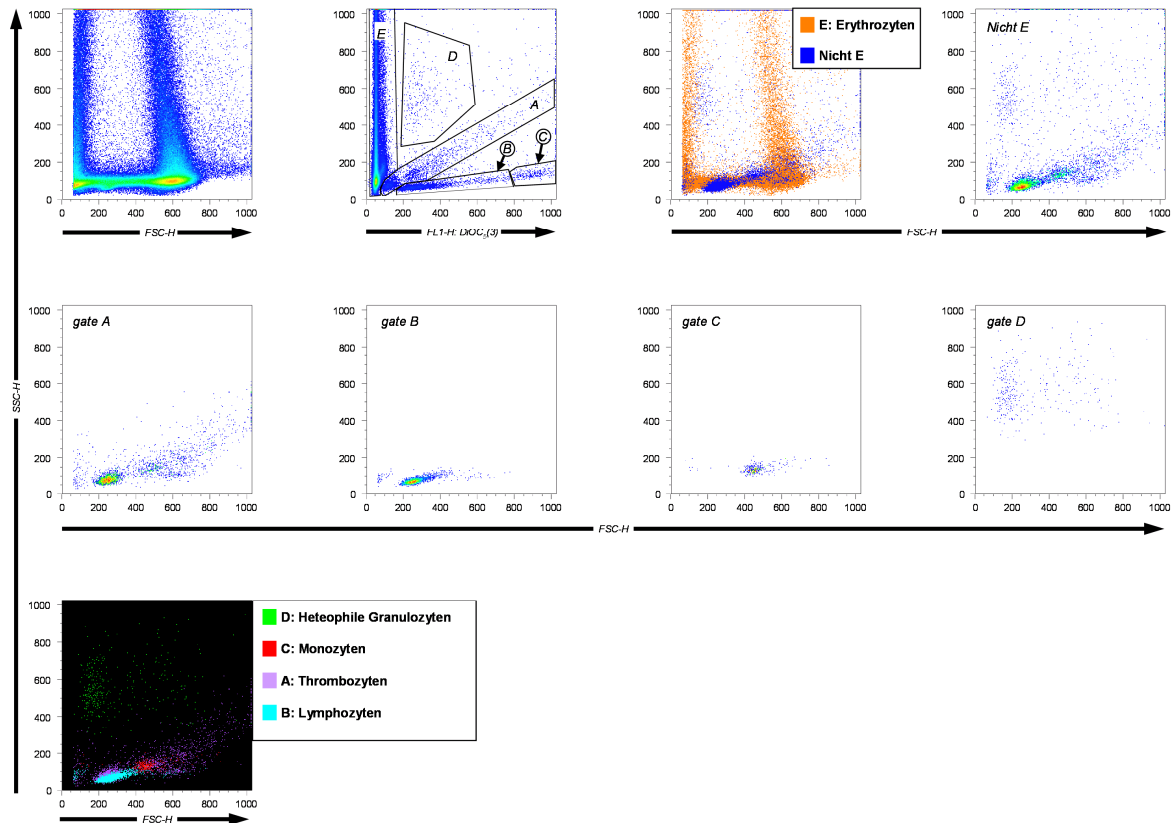


Abb. 4:
Färbung von Hühnerblut mit 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine (DiOC₅(3))

In einem weiteren Experiment wurden mit Ficoll-Dichtegradientenseparation angereicherte Hühner-PBMCs mit DiOC₅(3) gefärbt (Abb. 4). Es sollte zum einen untersucht werden, ob die DiOC₅(3)-Färbung auch eine Leukozytendifferenzierung bei angereicherten PBMCs erlaubt. Dies würde ggf. neue Anwendungen der DiOC₅(3)-Färbung erlauben. Zudem hatte der Versuch Kontrollfunktion. Würden die üblicherweise in aufgereinigten PBMCs enthaltenen Zellpopulationen (Lymphozyten, Thrombozyten, Monozyten) in der DiOC₅(3)-Färbung in den im Vollblut identifizierten gates der betreffenden Populationen zu liegen kommen, wäre dies ein Hinweis dafür, dass die DiOC₅(3)-Technik die Populationen tatsächlich korrekt identifiziert. Das Ergebnis überraschte insofern, als in der untersuchten Probe zahlreiche Granulozyten nachgewiesen wurden. Diese finden sich nur gelegentlich in Ficoll-PBMC-Präparationen. Eine abgrenzbare Monozytenpopulation ließ sich nicht darstellen. Es gelang aber eine akzeptable Abtrennung der Erythrozyten (Y) gegenüber den Thrombozyten und Leukozyten (X) im FL1-H/SSH-H-Pseudocolourplot (Abb. 5). Eine separate Darstellung von Thrombozyten und Lymphozyten gelang hingegen nicht.

Ergebnisse

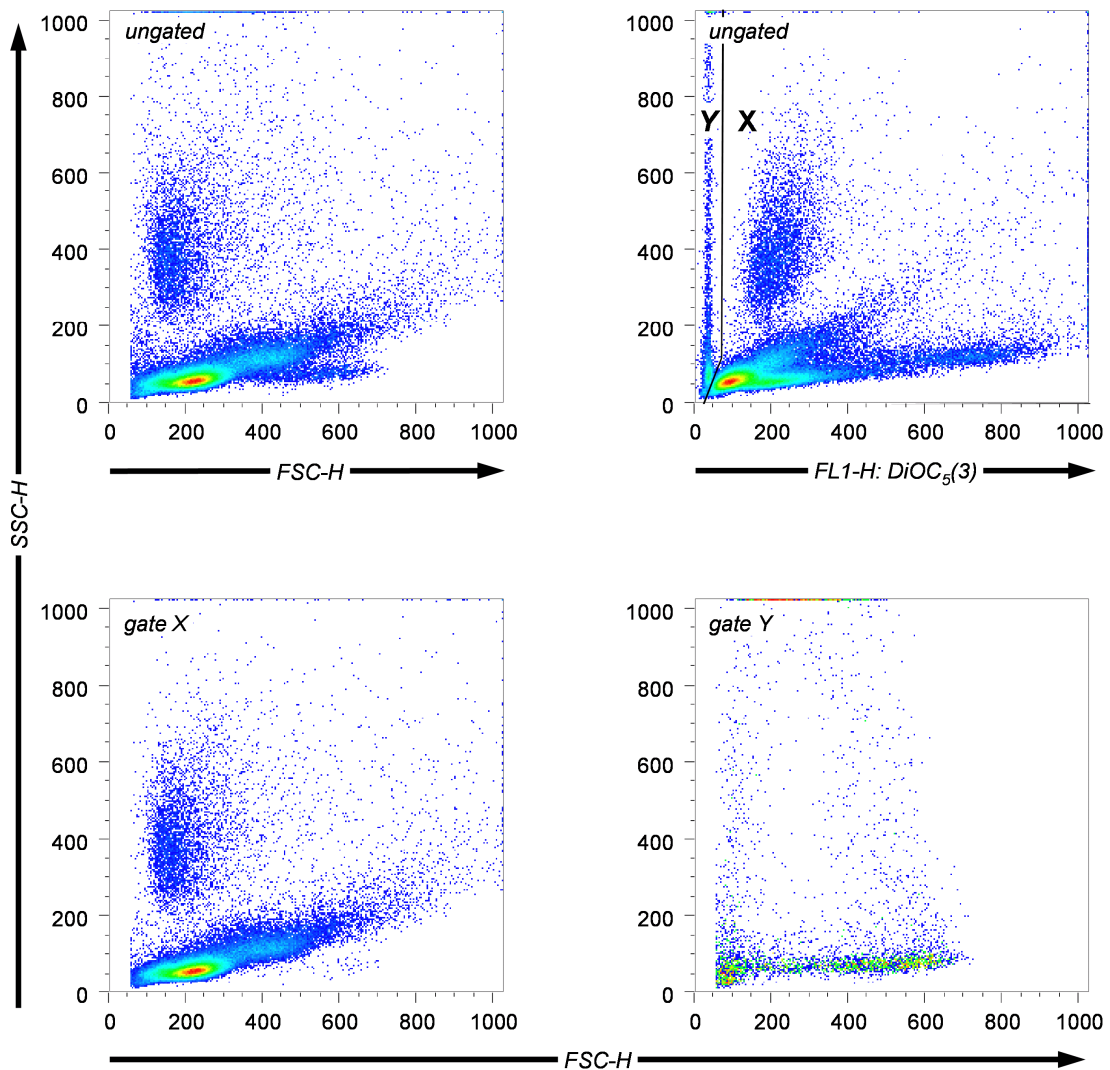


Abb. 5:
DiOC₅(3)-Färbung von mittels Ficoll-Dichtegradientenseparation angereicherten Hühner-PBMCs
X: Leukozyten und Thrombozyten
Y: Erythrozyten

5.1.2 Exoten

Da die Entwickler der DiOC₅(3)-Technik gezeigt haben, dass ihre Methode die Untersuchung des Blutes von Wachteln, Hühnern, Gänsen und Enten ermöglicht, sollte überprüft werden, ob dies auch für das Blut anderer für die Vogelmedizin relevanter Vogelspezies gilt.

So wurde Blut verschiedener Papageienspezies auf diese Weise gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Als Untersuchungsmaterial dienten nicht mehr benötigte Reste von Blutproben, die Ziervogelpatienten der Klinik für Vögel der

Ergebnisse

Tierärztlichen Fakultät zu diagnostischen Zwecken entnommen worden waren. Die Einstellungen des Durchflusszytometers wurden zuvor bei der Messung einer Hühnerblutprobe vorgenommen und dann für das Papageienblut beibehalten. Obwohl die Proben teilweise bereits unbestimmte Zeit gekühlt oder auch bei Raumtemperatur gelagert worden waren, zeigten die graphischen Auswertungen der Messungen ein ähnliches Muster wie zuvor das Hühnerblut. Allerdings waren nur bei einer der Proben (Graupapagei) alle im Hühnerblut sichtbaren Populationen zu erkennen (Abb. 6).

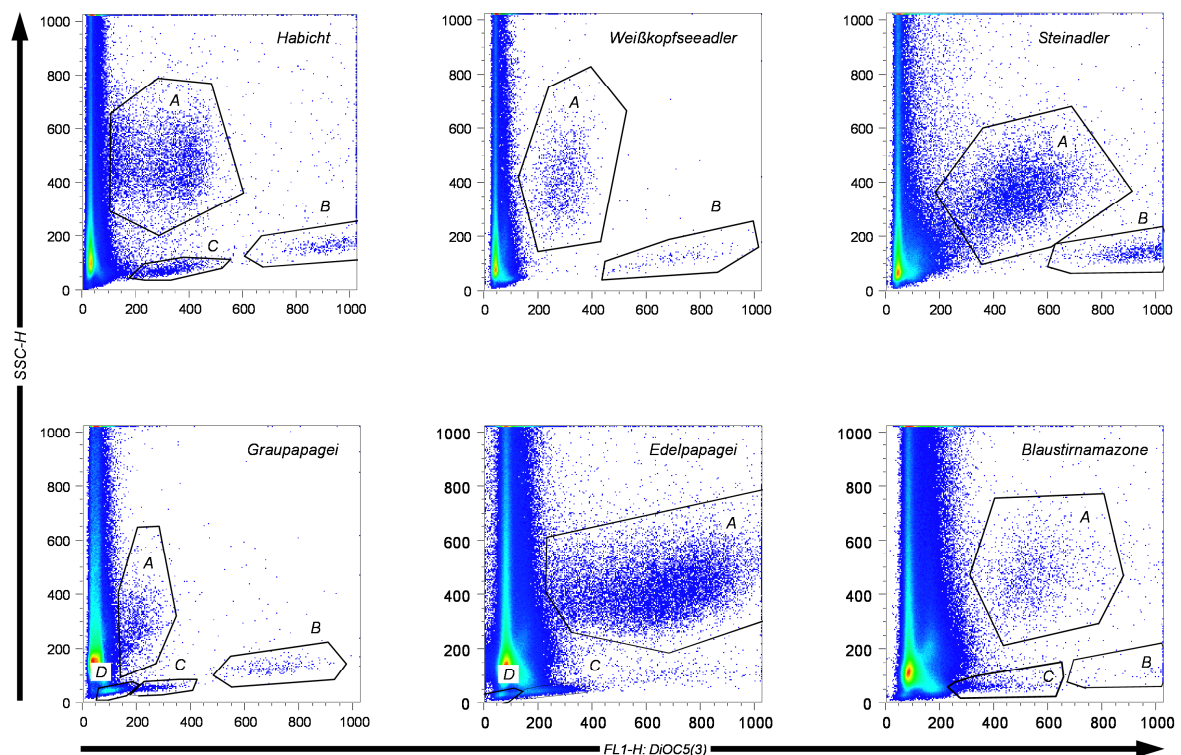


Abb. 6:
Färbung von Greifvogel- und Papageienblut mit 3,3'-Dipentylloxacarbocyanine (DiOC₅(3))
A: Granulozyten; B: Monozyten; C: Lymphozyten; D: Thrombozyten

5.1.3 Greifvögel

Um Hinweise zu erhalten, ob das DiOC₅(3)-Verfahren auch bei der Untersuchung von Blutproben von Greifvögeln Anwendung finden könnte, wurden in gleicher Weise wie bei den Papageien, je eine von der Klinik für Vögel der Tierärztlichen Fakultät zur Verfügung gestellte Blutprobe der Greifvogelspezies Habicht, Weisskopfseeadler und Steinadler mit der DiOC₅(3)-Methode untersucht. In der Auswertung von allen drei Blutproben sind die Populationen Heterophile und Monozyten erkennbar (Abb. 6). Eine Lymphozytenregion konnte aber nur im Blut des Habichtes differenziert werden.

Eine Darstellung der Thrombozytenpopulation gelang nicht. Auf weitergehende Untersuchungen des Blutes von Zier- und Greifvogelpatienten der Klinik für Vögel mit der DiOC₅(3)-Methode wurde im Folgenden bewusst verzichtet. Stattdessen wurde beschlossen, das Verfahren an einer Modellspezies genauer zu testen. Aufgrund seiner schon erwähnten besonderen Bedeutung für den Menschen fiel die Wahl dabei auf das Haushuhn.

5.2 Färbung von Vollblut

In Forschungsarbeiten zur Hühnerimmunologie geht der Untersuchung von Leukozytensubpopulationen in der Regel die Isolierung der Leukozyten mit Hilfe spezieller Zentrifugationstechniken voraus, um sie von den störenden nicht lysierbaren Erythrozyten abzutrennen. Auf diese Weise aufbereitete Proben erlauben jedoch keine absolute Quantifizierung der betreffenden Zellen bezogen auf das Blutvolumen. Zudem enthalten solche üblicherweise mit Hilfe der „slow speed“ Zentrifugation oder „Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation“ hergestellten Zellpräparationen keine oder nur sehr wenige Granulozyten da diese zusammen mit den Erythrozyten abgetrennt werden.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde die von Burgess et al. beschriebene Methode zur durchflusszytometrischen Zählung von Leukozyten-Subpopulationen in Hühnerblut etabliert (Luhtala 1998). Die Technik basiert im Wesentlichen auf einem beispielsweise in der Humanmedizin bei der AIDS-Diagnostik und AIDS-Therapieüberwachung routinemäßig für die Quantifizierung der CD4⁺-T-Lymphozyten eingesetzten Verfahren. Es werden dabei direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte monoklonale Antikörper eingesetzt. Das von Burgess et al. entwickelte Verfahren unterscheidet sich aber von den üblicherweise z.B. in der Humanmedizin eingesetzten Methoden durch Anwendung des No-Lyse Prinzips. Angesichts der Tatsache dass sich Vogelerythrozyten bisher nicht lysieren lassen, ohne auch die Leukozyten schwer zu schädigen oder zu zerstören, wird dabei auf die Zugabe lysierender Agenzien verzichtet. Stattdessen wird die Blutprobe vor der Messung stark verdünnt, um eine Zellkonzentration zu erhalten, die vom Durchflusszytometer noch verarbeitet werden kann. Um dennoch eine ausreichende Anzahl an Leukozyten erfassen zu können, muss die Messdauer auf ein Vielfaches erhöht werden, da es sich ja bei der überwiegenden Mehrzahl der in der Probe vorhandenen Zellen um Erythrozyten handelt. Auf die von Burgess et al. zusätzlich angewandte Technik der absoluten Quantifizierung wurde in den folgenden

Experimenten vorerst verzichtet. Zunächst lag der Fokus auf der Identifizierung der verschiedenen Leukozyten. Eine absolute Quantifizierung sollte erst nach erfolgreichem Abschluss dieses Etappenziels versucht werden.

5.2.1 No-Lyse-Färbung von Vollblut

So hatten die im folgenden beschriebenen Experimente zum Ziel herauszufinden, wie Hühnerleukozyten ohne Lyse der Erythrozyten und ohne Isolierung im Vollblut durchflusszytometrisch am besten dargestellt werden können.

Exemplarisch wurde versucht die CD4⁺-T-Lymphozyten zu identifizieren. Dabei kamen 4 verschiedene Variationen der üblicherweise zur Färbung von isolierten PBMCs genutzten Technik zum Einsatz (s. 4.6.3.3).

αHuhn-CD4-IgG-FITC-Direktkonjugat ohne Waschschrift

αHuhn-CD4-IgG-FITC-Direktkonjugat mit Waschschrift

primärer Maus-αHuhn-CD4-IgG + sekundärer Ziege-α-Maus-IgG-FITC ohne Waschschriffe

primärer Maus-αHuhn-CD4-IgG + sekundärer Ziege-α-Maus-IgG-FITC mit Waschschriften

In der Auswertung der Messungen musste auf ein Gating der PBMCs in der FSC/SSC-Darstellung, wie es bei der Färbung von isolierten PBMCs üblicherweise vorgenommen wird, verzichtet werden, weil bei der Vollblutfärbung die Leukozytenpopulationen in dieser Darstellung vollständig durch einen „Schleier“ von Erythrozyten verdeckt werden (Abb. 7). Die Heterogenität der Erythrozytenpopulation in der FSC-H/SSC-H-Darstellung (Abb. 7 b) kommt durch die elliptische Form der Vogelerythrozyten zu Stande (Moritomo et al. 2002; Uchiyama et al. 2005). Je nach Orientierung des Erythrozyten in Relation zum Laserstrahl bzw. zum Detektor im Moment der Messung kann es durch ein- und dieselbe Zelle zu unterschiedlichen Messwerten kommen. Eine willkürliche Festlegung des PBMC-gates oder eine Übertragung des gates aus einer Messung durch Isolierung gewonnener Leukozyten brächte die Gefahr mit sich, Lymphozyten durch fehlerhaftes gating von der Analyse auszuschließen. Ein solches Vorgehen wäre damit nicht vereinbar mit dem Ziel der absoluten Quantifizierung der zu untersuchenden Zellpopulationen.

Ergebnisse

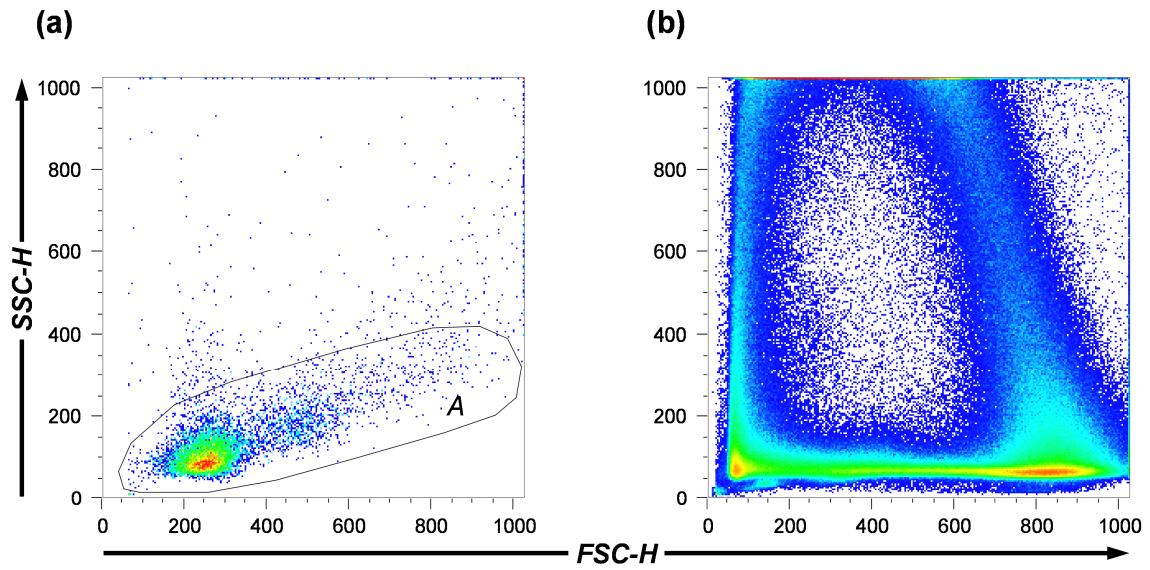


Abb. 7:

- a) Mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnene Zellen aus Hühnerblut mit gate A um die PBMCs
- b) Verdünntes Hühnerblut mit die Leukozyten verdeckendem „Erythrozytenschleier“

Ergebnisse

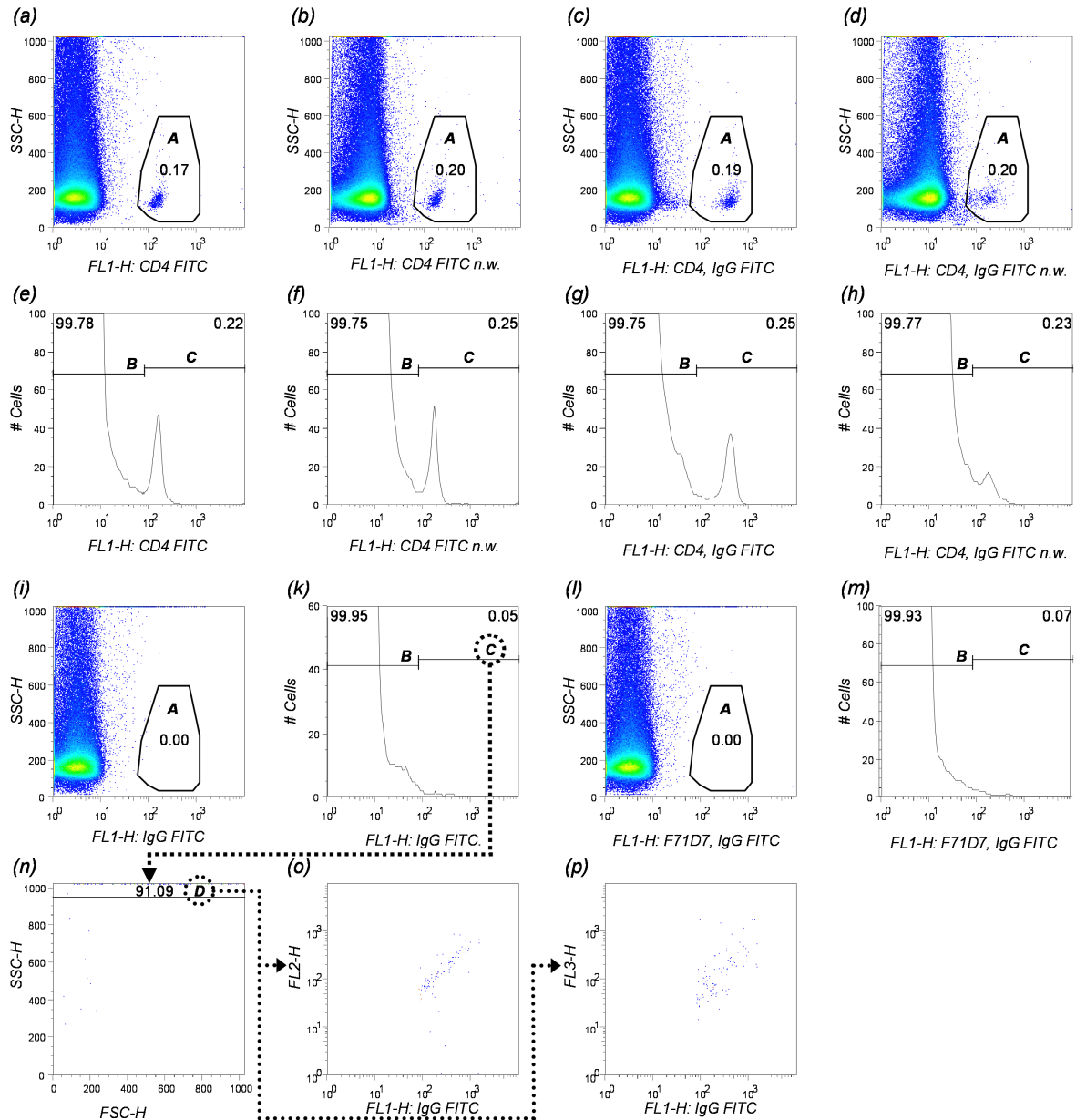


Abb. 8:

Ergebnisse verschiedener Färbe-Protokolle zur Darstellung der CD4 positiven T-Lymphozyten in Vollblut

- | | |
|---------------------------------|---|
| a, e: CD4 FITC: | Direktkonjugat mit Waschschrift |
| b, f: CD4 FITC n.w.: | Direktkonjugat ohne Waschschrift (n.w.= no wash) |
| c, g: CD4 IgG FITC: | primärer AK und sekundärer AK mit Waschschrift |
| d, h: CD4 IgG FITC n.w.: | primärer AK und sekundärer AK ohne Waschschrift (n.w.= no wash) |
| i, k: IgG FITC: | Kontrolle mit sekundärem AK |
| l, m: F71D7, IgG FITC: | Isotypenkontrolle mit sekundärem AK |
| n, o, p: | Charakterisierung der „falsch“-FL1-H positiven Ereignisse in der Kontrolle mit sekundärem AK |

Alle vier Protokolle führten zu einer Färbung der CD4⁺-T-Lymphozyten (Abb. 8 a,b,c,d). Die schlechteste Diskriminierung zwischen negativer und positiver Population weist die ohne Waschschrift durchgeführte Färbung mit primärem und sekundärem Antikörper auf (Abb. 8 d, h).

Ergebnisse

Bei der genaueren Auswertung von Kontrollen und eigentlichen Färbungen zeigte sich eine bedeutende Konsequenz der Vollblutfärbetechnik, welche bei der Anwendung der üblichen Gatingstrategie die ermittelte Anzahl CD4 positiver Zellen fehlerhaft beeinflussen kann.

Im Histogramm der Kontrollfärbungen (k, m) sind FL1-H positive Ereignisse (gate C) vorhanden. Diese machen zwar nur zwischen 0,05 und 0,07% aller Ereignisse aus. Die Kontrollen weisen damit aber bereits etwa einen Anteil von etwa 23 - 28% der Gesamtzahl (0,22 – 0,25%) positiver Ereignisse der eigentlichen Messungen (Abb. 8 e,f,g,h,) auf.

Durch Anzeige von gate C in der FSC/SSC-Darstellung (n) können die fraglichen Zellen in den Kontrollfärbungen zu über 90% als hochgranulierte, bereits an der Grenze des SSC-Messbereichs liegende Partikel angesprochen werden. Dass diese in gate D gelegenen Zellen hohe Fluoreszenzen in allen Kanälen aufweisen (o,p) lässt den Schluss zu, dass es sich dabei um tote oder stark geschädigte autofluoreszierende Zellen handelt.

Alternativ zur Festlegung positiver Ereignisse über das FL1-H Histogramm (gate C) wurde eine andere gatingstrategie entwickelt. Im FL1-H/SSC-H dotplot (Abb. 8 a,b,c,d,i,l) wird dabei ein gate (A) um die FL1-H positiven Zellen niederer bis mittlerer Granularität gelegt. Dieses gate A grenzt die kritischen hochgranulierten, autofluoreszierenden Ereignisse aus und ermöglicht damit eine noch wesentlich exaktere Auswertung bzw. Quantifizierung positiver Zellen. In den Kontrollen enthält gate A 0% aller Ereignisse (i,l). Die mit diesem Verfahren bestimmten Prozentsätze an CD4⁺T-Lymphozyten (0,17-0,20%) (Abb. 8 a,b,c,d) sind erwartungsgemäß niedriger als die mit gate C ermittelten (0,22 – 0,25%) (Abb. 8 e,f,g,h). Die Differenz (~0,05%) entspricht etwa dem Anteil der in den Kontrollen in gate C nachweisbaren hochgranulierten, autofluoreszierenden Zellen (0,05 -0,07%) (Abb. 8k,m).

Im Vergleich liefern die verschiedenen eingesetzten Färbeprotokolle ähnliche Prozentsätze an CD4 positiven T-Lymphozyten. In Gate A liegen 0,17–0,20%; in Gate C 0,22–0,23%. Die unspezifische Fluoreszenz der negativen Population wird durch Verzicht auf die Waschschrte erhöht. So weist diese in Abb. 8 b. und f bzw. d und h eine höhere MFI auf als in Abb. 8 a und e bzw. c und g. Die positive Population ist lediglich in der indirekten Färbung mit Waschschrte (Abb. 8 g) stärker gefärbt als in den übrigen Färbungen (Abb. 8 e,f,h). Damit lässt sich für weitere Untersuchungen schlussfolgern:

Hoch exprimierte Antigene wie CD4 lassen sich im Vollblut sowohl in direkten als auch in indirekten Färbungen darstellen.

Die Qualität der direkten Färbung wird durch den Verzicht auf den Waschriss (No-Lyse No-Wash-Technik) in erträglichem Maße verschlechtert.

Bei der indirekten Färbung ohne Waschschriss verschlechtert sich die Unterscheidbarkeit positiver und negativer Populationen aber deutlich und dürfte bei niedriger exprimierten Antigenen weitgehend verloren gehen.

Auf ein PBMC-gate in der FSC/SSC-Darstellung wie es üblicherweise bei der Färbung aufgereinigter PBMC-Präparationen eingesetzt wird, muss aufgrund des „Erythrozytenschleiers“ in der Vollblutfärbung verzichtet werden.

Durch alternatives gating im dotplot FL/SSC können die in der FL/Histogramm Darstellung fälschlich erhöhten Zahlen der positiven Zellen vermieden werden.

5.3 Kombination von 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3)) mit mAKs

Nach der Etablierung der No-Lyse No-Wash-Vollblutfärbetechnik konnte nun im weiteren überprüft werden, ob die mit Hilfe der monoklonalen Antikörper darstellbaren Zellpopulationen mit denen der DiOC₅(3)-Färbung identisch sind. Dazu wurden Doppelfärbungen mit DiOC₅(3) und jeweils einem Leukozytenmarker durchgeführt (s. 4.6.3.2.2). Aus den vorangegangenen Experimenten war bereits bekannt, dass DiOC₅(3) aufgrund seiner starken Fluoreszenz und eines breiten Emissionsspektrums nicht nur in Kanal FL1-H sondern auch in FL2-H und FL3-H stark fluoresziert und damit nur sehr bedingt für Mehrfachfärbungen an einem lediglich mit einem 488 nm Laser ausgestatteten Durchflusszytometer geeignet ist. Da eine ausreichende Kompensation in Kanal FL2-H nicht gelang, musste auf einen in FL3-H sichtbaren Farbstoff ausgewichen werden. Mangels Verfügbarkeit von Direktkonjugaten kam ein α -IgG-Alexa Fluor 647-RPE zum Einsatz. Dies erlaubte zudem die Verwendung von gegen verschiedene Leukozytensubpopulationen gerichteten primären Antikörpern. Zunächst wurden an einer nur mit DiOC₅(3) gefärbten Probe der zusätzlich das α -IgG-Alexa Fluor 647-RPE zugegeben worden war die Geräteeinstellungen vorgenommen. Die in den mit zusätzlichen Antikörpern gefärbten, gegenüber der Kontrolle in FL3-H positiven Zellen, wurden in einem

Ergebnisse

FL3-H-Histogramm identifiziert und zweidimensional im FL1-H/SSC-H dotplot dargestellt (Abb. 9). Die für K1 positiven Zellen kamen dabei wie erwartet in der Region zu liegen, in der bereits bei der DiOC₅(3)-Färbung die Thrombozyten identifiziert wurden. Die CD4-positiven Zellen befinden sich ebenfalls in der bei der DiOC₅(3)-Färbung identifizierten Lymphozytenregion. Eine genauere Analyse der Monozyten mit Hilfe des Antikörpers KUL01 war aufgrund deren äußerst starker DiOC₅(3)-Färbung nicht möglich. Ursache hierfür war, dass am FACScan im Gegensatz zu Zytometern neuerer Bauart FL3-H nicht gegen FL1-H kompensiert werden kann und eine Kompensation gegen FL2-H wegen des breiten Emissionsspektrums von DiOC₅(3) unzureichend war. Deshalb konnte nicht bewiesen werden, dass es sich bei der in allen Färbungen einschließlich der Kontrolle vorhandenen Population im Bereich zwischen 400 und 600 FL1-H um Monozyten handelt. In der Doppelfärbung mit dem gegen CD45 gerichteten Panleukozytenmarker 16-6 konnte die relativ gute Abgrenzung der Leukozyten gegen die Erythrozyten bei der DiOC₅(3)-Färbung bestätigt werden. In der CD45-Färbung zeichnet sich auch eine undeutliche kleine Population von Granulozyten ab.

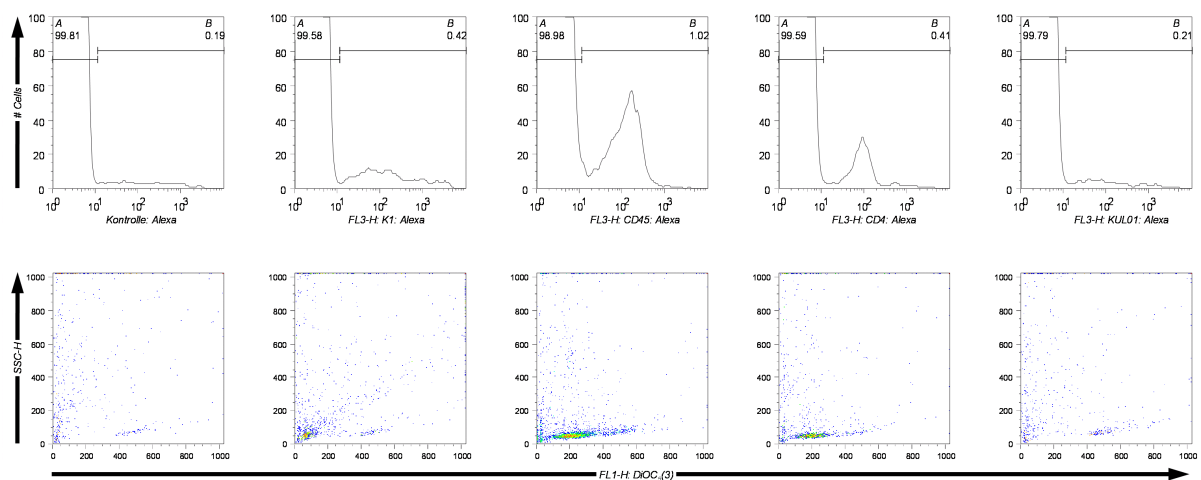


Abb. 9:
Hühnerblut gefärbt mit 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine (DiOC₅(3)) und verschiedenen Leukozytenmarkern
Indirekte Färbung mit primärem AK und sekundärem α-IgG-Alexa Fluor 647-RPE

Schlussfolgerungen:

DiOC₅(3) färbt Leukozyten und Thrombozyten beim Huhn.

Doppelfärbungen mit DiOC₅(3) und verschiedenen Leukozytenmarkern deuten darauf hin, dass Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten allein durch den Einsatz von DiOC₅(3) dargestellt werden können.

Ergebnisse

Bei der Einfachfärbung mit DiOC₅(3) sind verschiedene Populationen aber nicht deutlich voneinander getrennt, so dass eine zuverlässige Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und die Erstellung eines Differentialblutbildes ohne weitere Optimierungen nicht möglich erscheinen.

Die starke Fluoreszenz von DiOC₅(3) in FL1-H, FL2-H und FL3-H schränkt die Aussagekraft von Mehrfachfärbungen stark ein.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der DiOC₅(3)-Färbung und der guten Ergebnisse bei der Färbung mittels monoklonaler Antikörper sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch Einsatz monoklonaler Antikörper auf der Basis der No-Lyse No-Wash-Technik die Gesamtleukozytenzahl in Hühnerblutproben ermittelt und eine Leukozytendifferenzierung vorgenommen werden kann.

5.4 Panleukozytenfärbung

Die Darstellung von Leukozyten und Thrombozyten erfolgte zunächst mit dem α CD45-Antikörper 16-6. Es wurden dabei vergleichend ein FITC-Direktkonjugat und eine Kombination aus primärem α CD45 und sekundärem Ziege- α -Maus-IgG2a-FITC eingesetzt (Abb. 10). Gefärbt wurden jeweils eine reine (Abb. 10 a,d) und eine durch Erythrozyten kontaminierte (Abb. 10 b,e) mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnene PBMC-Suspension, sowie eine verdünnte Blutprobe (Abb. 10 c,f). Im FL1-H-Histogramm der indirekten Färbungen der PBMC-Suspensionen (Abb. 10 a,b,d,e) stellten sich Erythrozyten (A) als negative, Thrombozyten (B) als mittel- und Leukozyten (C) als hochpositive Ereignisse dar. In der indirekten Färbung (Abb. 10 a,b) weisen alle Populationen höhere MFIs auf als in der direkten (Abb. 10 d,e). In der direkten Färbung der erythrozytenhaltigen PBMC-Suspension (Abb. 10 e) kam es durch die schwächere Färbung bereits zu einer deutlichen Überschneidung von Thrombozyten (B) und Erythrozyten (A). In beiden Blutfärbungen (Abb. 10 c,f) sind eine positive Population E und eine negative Population D zu erkennen. In Verbindung mit den entsprechenden Färbungen der PBMC-Suspension liegt nahe, dass es sich bei E um die Leukozyten und bei D um Erythrozyten und Thrombozyten handelt. Der geringere Abstand zwischen negativer und positiver Population in der indirekten Färbung deckt sich mit den Ergebnissen der CD4-Färbung in Abb. 8.

Ergebnisse

Nun war gezeigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Darstellung der Leukozyten mittels direkter Färbung im verdünnten Vollblut möglich ist.

Im Folgenden galt es nun einen Weg zu finden, um die Thrombozyten im verdünnten Vollblut darzustellen - einerseits um sie quantifizieren zu können - andererseits um sicher zu gehen, dass sie nicht fälschlicherweise für Leukozyten gehalten und damit zu falsch erhöhten Leukozytenzahlen führen würden.

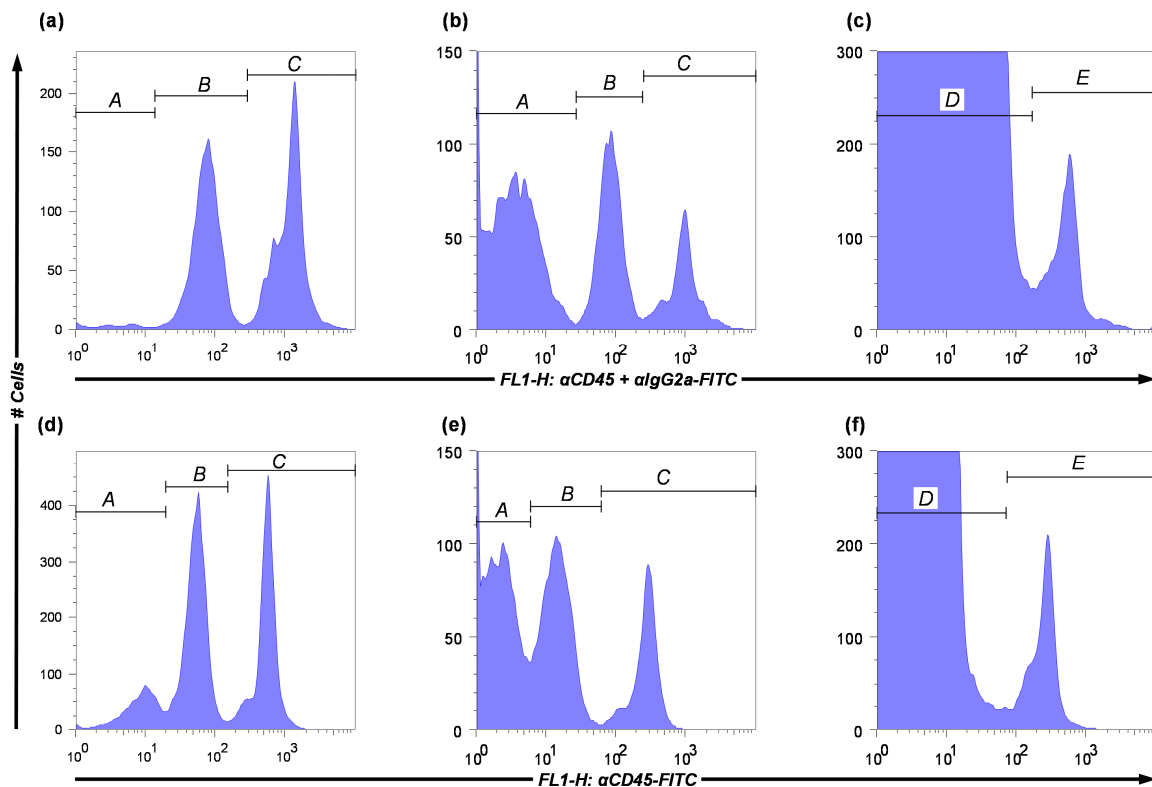


Abb. 10:
Indirekte und direkte durchflusszytometrische Färbung mit α CD45-FITC;
Färbung von mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnenen PBMCs aus Hühnerblut: a,b,d,e
Färbung von verdünntem Hühnerblut: c,f;
Indirekte Färbung: a, b, c; direkte Färbung: d, e, f
Probe ohne Erythrozytenanteil: a,d; Probe mit Erythrozytenanteil: b,e

5.5 Thrombozytenfärbung

Zur Darstellung der Thrombozyten wurde zunächst ein monoklonaler Antikörper gegen CD41/61 eingesetzt.

Es wurde eine mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnene PBMC-Suspension mit einer Kombination aus primärem α CD41/61 und RPE-konjugiertem Ziege- α -Maus-IgG1 gefärbt. Die Thrombozyten stellen sich in dieser Färbung (Abb. 11 a) als distinkte Population deutlich abgesetzt von den übrigen Zellen dar. Auch in der Färbung von verdünntem Vollblut mittels RPE-konjugiertem CD41/61 lassen sich

Ergebnisse

die Thrombozyten in der Histogrammdarstellung (Abb. 11 b) trotz geringer Überschneidung noch zufriedenstellend von den übrigen Zellen abgrenzen.

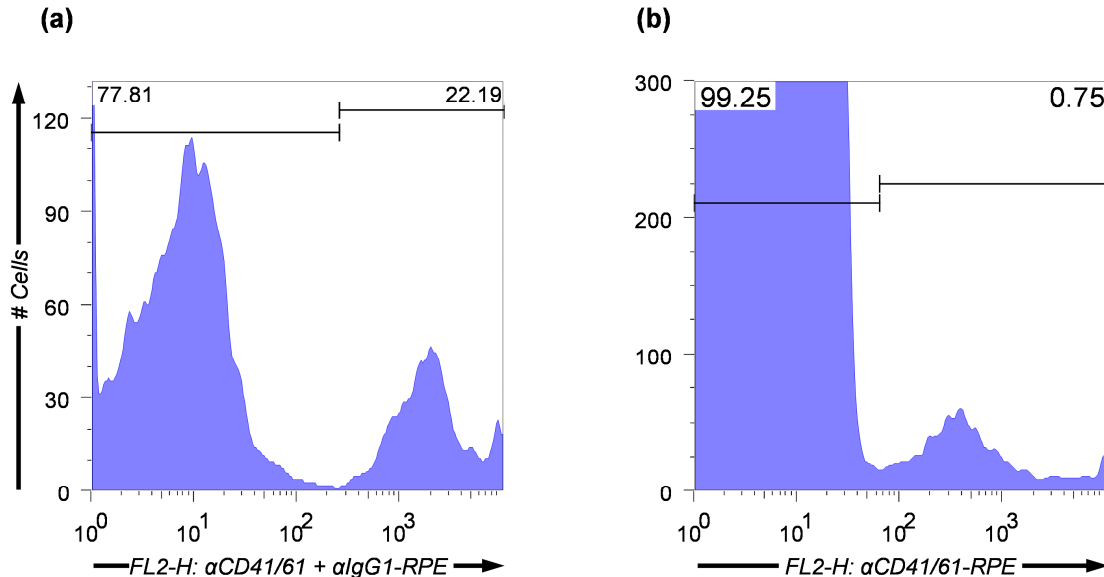


Abb. 11:

a) Indirekte Färbung von mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnenen PBMCs aus Hühnerblut mit α CD41/61 und α IgG1 RPE

b) Direkte Färbung von verdünntem Hühnerblut mit α CD41/61 RPE

5.6 Kombination von Panleukozytenfärbung und Thrombozytenfärbung mit den Antikörpern anti-CD45-FITC und anti-CD41/61 RPE

Im nächsten Schritt sollten in einer Doppelfärbung Leukozyten und Thrombozyten gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Eine PBMC-Suspension und eine Vollblutprobe wurden mit einem α CD45-FITC und einem α CD41/61 RPE Konjugat gefärbt. In der FL1-H/FL2-H-Pseudocolour-Darstellung der α CD45-FITC-Einfachfärbung (Abb. 12 d) des Vollblutes ist wie schon in der Histogramm-Darstellung des weiter oben beschriebenen Experiments (Abb. 10 f) keine eindeutige Abgrenzung zwischen Erythrozyten (A) und Thrombozyten (B) möglich. Auch zwischen Thrombozyten (B) und Leukozyten (C) kann hier keine klare Grenze gezogen werden. In der Doppelfärbung können aber sowohl für die PBMC-Suspension als auch für das Vollblut eindeutig Leukozyten (K), Thrombozyten (H) und Erythrozyten (G) abgegrenzt werden. Allerdings zeigt sich sowohl in der PBMC-Suspension (Abb. 12 c) als auch im Vollblut (Abb. 12 f) eine kleine, doppelt positive Population I, bei der es sich um gemischte Aggregate, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, handeln könnte. Die „zipfelmützenartige“ Ausziehung der

Ergebnisse

Thrombozytenpopulation E (Abb 28 e,f) in Richtung des doppelt positiven Bereichs kam möglicherweise durch Thrombozytenaggregate und/oder geschädigte/tote autofluoreszierende Zellen zustande.

Abgesehen von den beiden beschriebenen Auffälligkeiten war damit eine Technik zur durchflusszytometrischen Identifizierung von Leukozyten und Thrombozyten im Vollblut etabliert. In weiteren Experimenten musste nun geklärt werden, ob bzw. wie eine Differenzierung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen erreicht werden könnte.

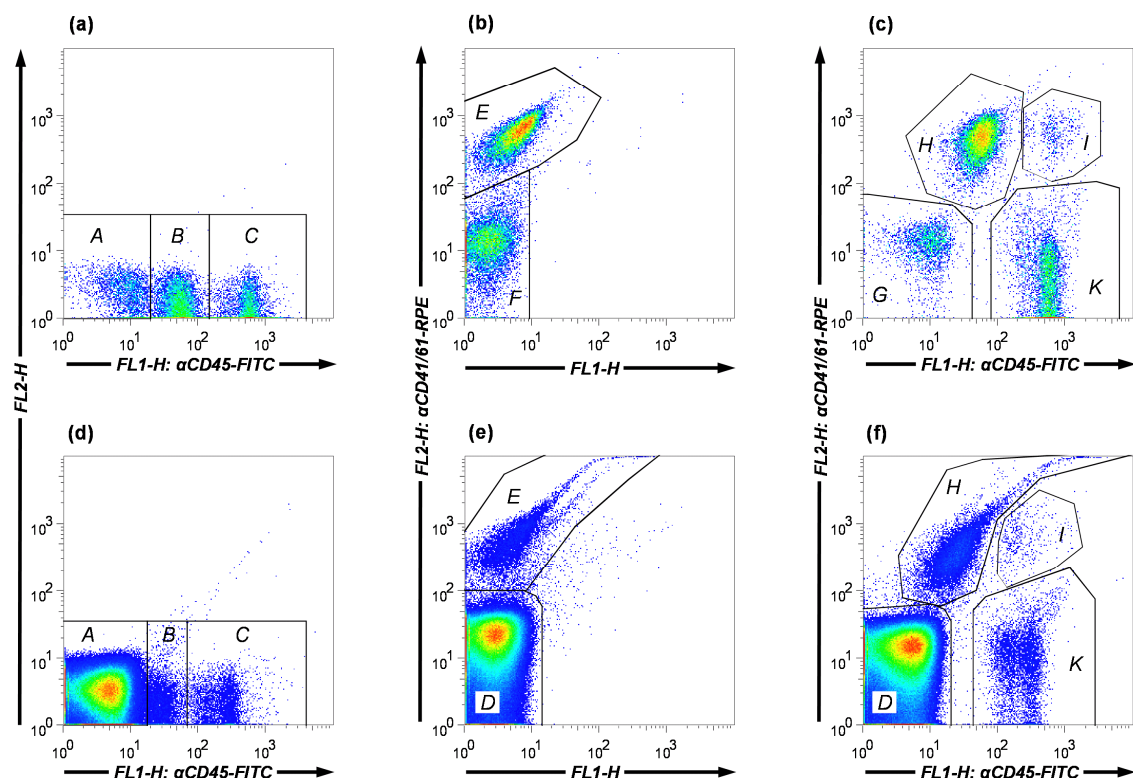


Abb. 12:
Färbung mit αCD45 FITC und αCD41/61 RPE
a,b,c: PBMC
d,e,f: verdünntes Blut
a, b, d, e: Einfachfärbung
c,f: Doppelfärbung
A: Erythrozyten; B: Thrombozyten, C: Leukozyten

5.7 Monozytendarstellung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers K1

5.7.1 Versuch der Monozytendarstellung in PBMC-Suspensionen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers K1

Es wurde eine mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnene PBMC-Suspension mit K1 und αIgG2a-RPE indirekt gefärbt. Damit gelang die Darstellung

der Monozyten als mittel positive Population (B) (Abb. 13 a) zwischen den negativen Zellen (Lymphozyten, ggf. Erythrozyten, Granulozyten) (A) und den stark positiven Thrombozyten (C).

5.7.2 Versuch der Monozytendarstellung im Vollblut mit Hilfe K1-RPE-Direktkonjugates

Um auch No-Lyse No-wash-Färbungen in Kombination mit dem α CD45-FITC durchführen zu können wurde der K1 mit RPE konjugiert.

Im nächsten Schritt wurde eine Vollblutprobe mit dem selbst hergestellten K1-RPE-Konjugat direkt gefärbt. Dabei gelang zwar eine deutliche Abgrenzung der positiven Thrombozyten (E) (Abb. 29 b) – eine Monozyten-Population neben den negativen Zellen ist im FL2-H-Histogramm jedoch nicht zu erkennen. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich aber bei der im FSC-H/FL2-H-dotplot erkennbaren Population G um die schwach positiven Monozyten (Abb. 29 c).

Um diese Population noch deutlicher von den negativen Ereignissen abgrenzen zu können, wurde versucht die Qualität der Färbung zu verbessern.

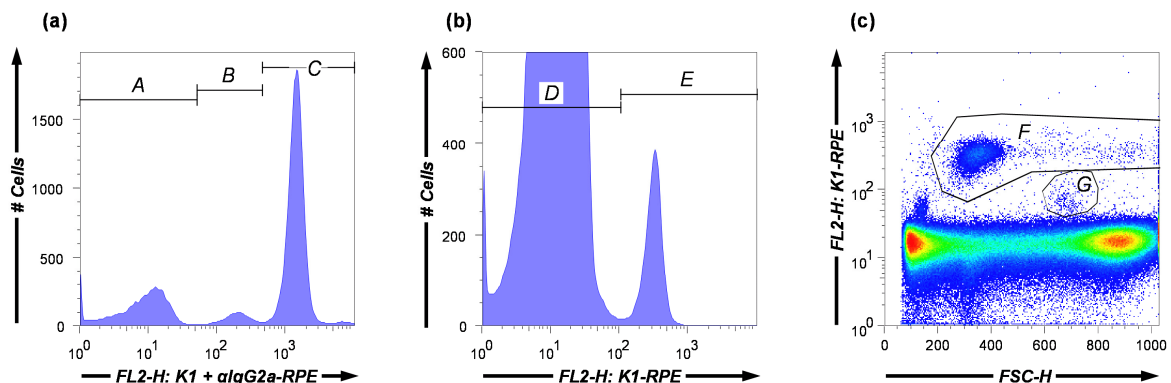


Abb. 13:
a: indirekte Färbung von PBMC mit α K1 und α lgG2aRPE
b,c: direkte Färbung von Hühnerblut mit α K1-RPE
A: Erythrozyten; **B,G:** Monozyten; **C,F:** Thrombozyten

5.8 Aufreinigung K1

Mit der Absicht die unspezifische Färbung zu verringern, wurde das selbst hergestellte K1-RPE-Konjugat deshalb mittels Gelchromatographie von ungebundenem RPE und unkonjugiertem K1 befreit.

Im Vergleich zweier Vollblut-Färbungen zeigt das gelchromatographisch aufgereinigte K1-RPE aber keinen Vorteil gegenüber dem ursprünglichen Konjugat. Im Overlay der beiden FL2-H-Histogramme (Abb. 14 a) unterscheiden sich beide

Ergebnisse

Färbungen nicht relevant. Im FSC/FL2-H dotplot ist in der Färbung mit gelchromatographisch aufgereinigtem K1-RPE (c) keine Monozytenpopulation B zu erkennen. Die in der Population A vermehrt enthaltenen Ereignisse mit großen FSC-H-Werten lassen sich aufgrund ihrer starken Färbung eher als Thrombozytenaggregate interpretieren. Obwohl (b) und (c) an verschiedenen Tagen durchgeführte Färbungen unterschiedlicher Blutproben darstellen, wurde aufgrund der geringen Unterschiede und des standardisierten Protokolls darauf geschlossen, dass sich durch den Einsatz gelchromatographisch aufgereinigten Konjugates die Qualität von K1-Färbungen nicht relevant verbessert. Aufgrund des hohen Aufwandes und der bei der Chromatographie entstehenden Verluste sowie der Verdünnung des Konjugats wurde bei weiteren K1-Konjugationen auf die Aufreinigung verzichtet.

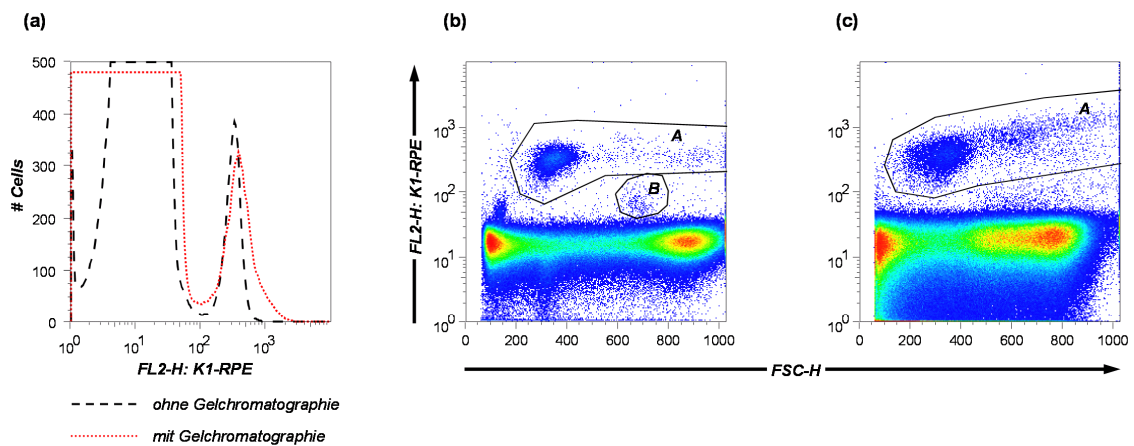


Abb. 14:
Vergleich der Färbereigenschaften eines gelchromatographisch aufgereinigten K1-RPE mit dem ursprünglichen Konjugat
a: Overlay; b: ursprüngliches Konjugat, c: aufgereinigtes Konjugat
A: Thrombozyten; B: Monozyten;

5.9 Kombination von Panleukozytenfärbung und Thrombozytenfärbung mit den Antikörpern anti-CD45-FITC und K1-RPE

Wie mit dem α CD41/61-RPE Antikörper wurde nun auch mit dem K1-RPE-Konjugat eine Doppelfärbung mit α CD45-FITC vorgenommen. In der α CD45-FITC/K1-RPE-Darstellung gelingt - ähnlich wie in Abb. 12 f eine sichere Darstellung von Thrombozyten (A) und Leukozyten (B). Bei den im gate C befindlichen FL1-H stark und FL2-H schwach positiven Ereignissen liegt der Verdacht nahe, dass es sich hierbei um Monozyten handeln könnte. Eine sichere Abgrenzung von den anderen Ereignissen der Population B erscheint jedoch nicht möglich.

Ergebnisse

Es wurde versucht die Leukozyten (B) durch Darstellung als FSC-H/SSC-H dotplot zu differenzieren. Dabei zeigte sich eine eindeutig abgrenzbare Population D. Auf Grund der hohen Granularität der Zellen und ihrer Frequenz von 11,6% kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um Granulozyten (Heterophile) handelt. Die eindeutige Identifikation einer Monozytenpopulation gelang bei diesem Experiment aber auch in dieser Darstellung nicht.

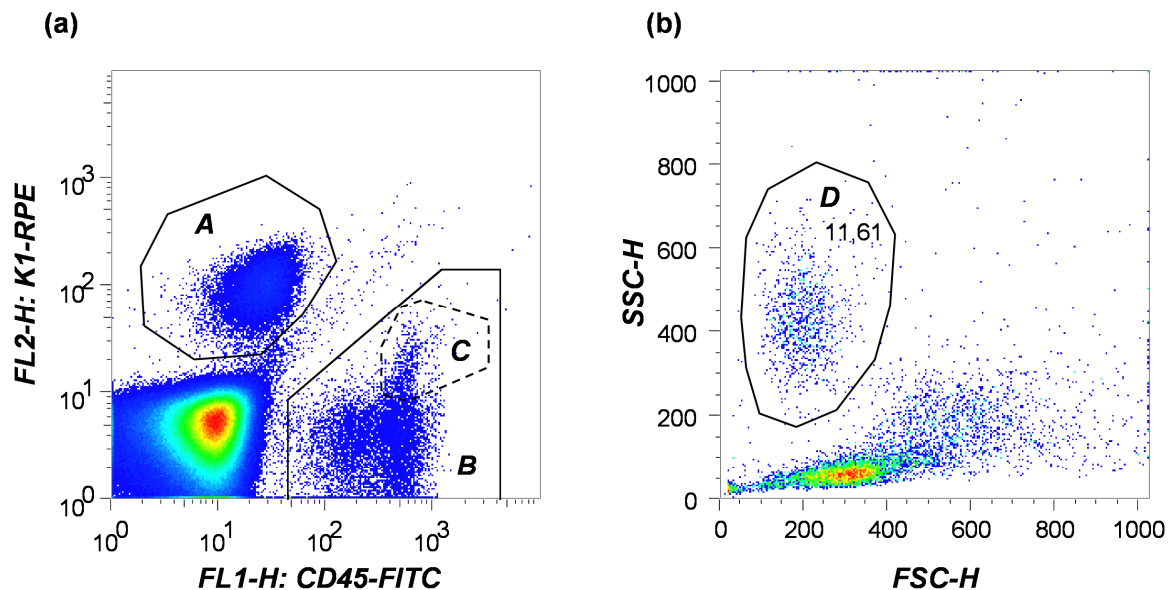


Abb. 15:
Durchflusszytometrische Doppelfärbung von Hühnervollblut mit α CD45-FITC und K1-RPE
a: ungegated; b: gate B
A: Thrombozyten; B: Leukozyten; C: Monozyten D: Granulozyten

In den folgenden Experimenten wurde versucht, durch den Einsatz zusätzlicher im eigenen Labor vorhandener oder kommerziell verfügbarer monoklonaler Antikörper eine weitergehende Differenzierung der Leukozyten zu ermöglichen. Um Leukozyten, Thrombozyten und Leukozytensubpopulationen darstellen zu können, sollte die bereits etablierte Zweifachfärbung zu verschiedenen Dreifachfärbungen erweitert werden. α CD41/61 bzw. K1 waren nun als RPE-Direktkonjugate verfügbar. α CD45 wurde mit PerCP konjugiert. Damit stand der Kanal FL1 zur Verfügung für Dreifachfärbungen mit FITC-konjugierten Markern.

5.10 Aufreinigung α CD45-PerCP

Um ggf. eine bessere Färbung zu ermöglichen wurde auch das α CD45-PerCP-Konjugat mittels Gelchromatographie von nicht konjugiertem α CD45 und PerCP befreit. Wie bei dem α K1-RPE-konjugat wurde auch für α CD45-PerCP durch die Aufreinigung keine relevante Verbesserung der Färbeeigenschaften erzielt.

5.11 Vergleich der Konjugate α CD45-FITC und α CD45-PerCP

Verglichen mit den durch den Einsatz von α CD45-FITC erzielten Resultaten zeigt die α CD45-PerCP Färbung einen geringeren Abstand zwischen negativer und positiver Population (Abb. 16). Die dargestellten Messungen repräsentieren die Färbung zweier Blutproben in unabhängigen Experimenten. Der beschriebene Trend war zwar bei allen folgenden Experimenten zu beobachten, die Qualität der α CD45-PerCP Färbungen war jedoch in nahezu allen Fällen ausreichend.

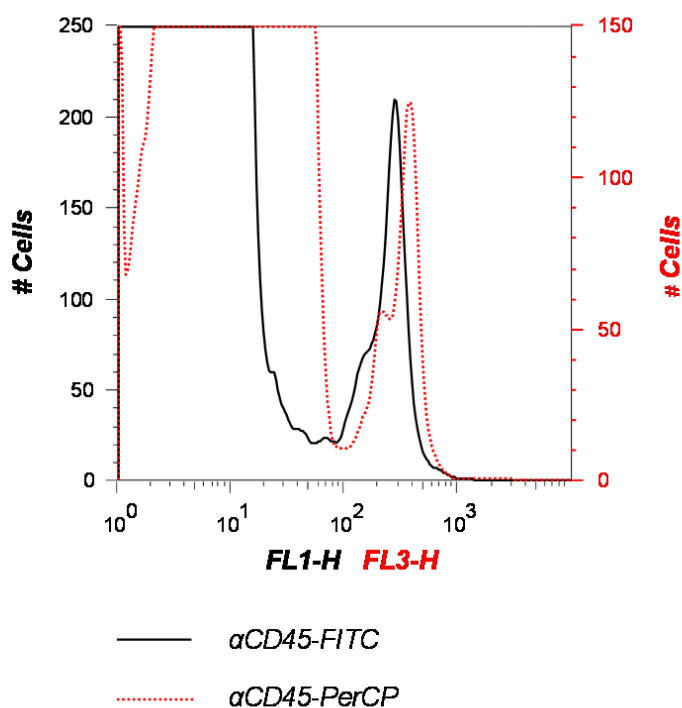


Abb. 16:
 Vergleich der Färbereigenschaften eines α CD45-PerCP mit denen eines α CD45-FITC

5.12 Kombination von Panleukozytenfärbung und Thrombozytenfärbung mittels K1-RPE/ α CD45-PerCP

Als Voraussetzung für weitere Experimente galt es nun zu zeigen, dass mit der Kombination K1-RPE/ α CD45-PerCP vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind, wie mit K1-RPE/ α CD45-FITC. Abb. 17 zeigt, dass in der Einfachfärbung (a,b) nur entweder die Leukozytenpopulation A oder die Thrombozytenpopulation B darstellbar sind. In der Doppelfärbung (c) sind jedoch Leukozyten (F) und Thrombozyten (C) gleichermaßen zu erkennen. Die Monozyten stellen sich als Population E dar, können aber nicht vollständig von den übrigen Leukozyten (F) abgegrenzt werden. In

Ergebnisse

der FSC-H/SSC-H-Darstellung (g) weist die Population E die für Monozyten charakteristische geringe Granularität auf. Zudem sind die Zellen größer als die Thrombozyten C (e) und der Großteil der anderen Leukozyten (d). Die FSC-H/SSC-H-Darstellung (d) aller Leukozyten (F) beinhaltet eine eigenständige Population G geringer Größe, die ihrer hohen Granularität zufolge vermutlich aus Granulozyten besteht. Bei der doppelt positiven Population D handelt es sich möglicherweise um Aggregate von Thrombozyten und Leukozyten. Dafür spricht auch ihre heterogene Darstellung im FSC-H/SSC-H-Dotplot (f). Die granulierten Ereignisse stellen vermutlich Aggregate aus Granulozyten und Thrombozyten dar, während die weniger granulierten Aggregate aus mononukleären Zellen und Thrombozyten repräsentieren könnten. Im Wesentlichen gleichen die Ergebnisse dieser Färbung denen der α CD45-FITC/K1-RPE-Färbung. Die Ursache für die stärkere Aggregatbildung konnte nicht eruiert werden. Die andere Position der Monozyten in der FSC-H/SSC-H-Darstellung(g) verglichen mit der lässt sich vermutlich auf die Verwendung eines anderen Durchflusszytometers zurückführen.

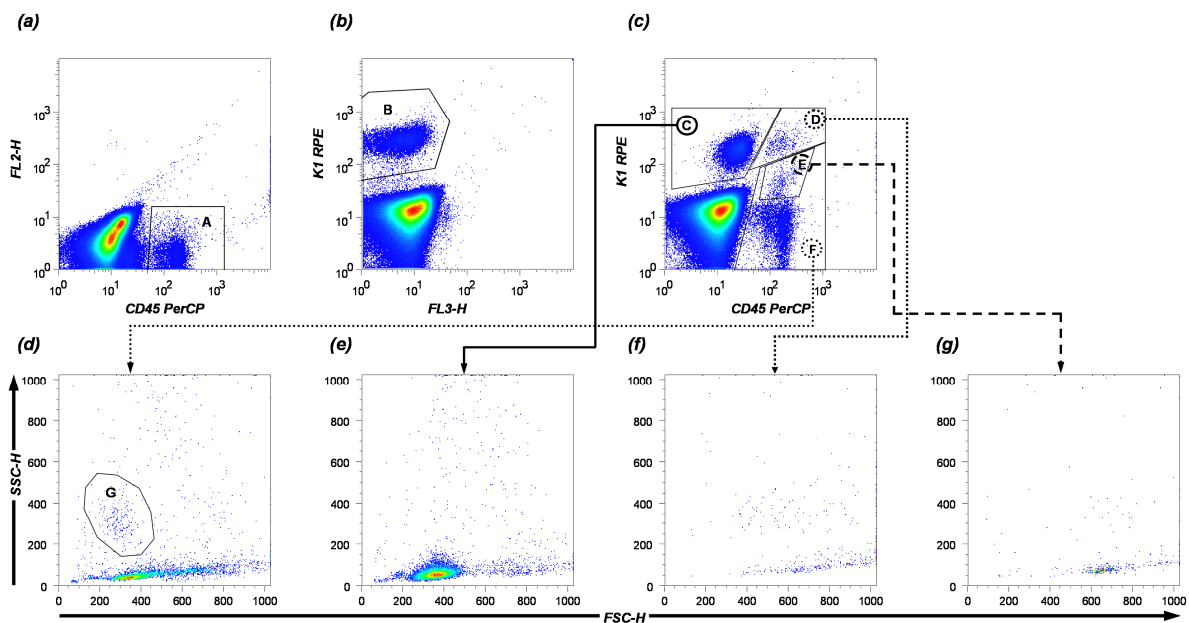


Abb. 17:
Durchflusszytometrische Färbung von Hühnerblut mit den mAKs K1-RPE und α CD45-PerCP.
(a): Einfachfärbung α CD45-PerCP (b): Einfachfärbung K1-RPE (c-g):Doppelfärbung K1-RPE und α CD45-PerCP

5.13 Färbungen zur Darstellung von Leukozytensubpopulationen

5.13.1 Monozytenfärbung mit KUL01

Um die Monozyten besser darstellen zu können, wurde die K1-RPE/ α CD45-PerCP Färbung um den monoklonalen Antikörper KUL01 ergänzt. Da beabsichtigt war,

Ergebnisse

später die Lymphozyten mit FITC konjugierten Markern zu identifizieren, wurde KUL01 als RPE-Konjugat eingesetzt. Abb. 18 zeigt, dass es hierdurch möglich war, die für K1-RPE nur schwach positiven Monozyten aus gate C (Abb. 18 a) in den stark positiven FL2-H-Bereich in gate D (Abb. 18 c) zu verschieben. Durch ihre starke Anfärbung mit α CD45-PerCP können sie von den ebenfalls für FL2-H stark positiven aber CD45 schwach positiven Thrombozyten (A) in Abb.1 a und c weiterhin gut unterschieden werden

Durch den Einsatz von K1-RPE, KUL01-RPE und α CD45-PerCP gelang damit die Differenzierung in Thrombozyten, Monozyten und die restlichen CD45-positiven Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten).

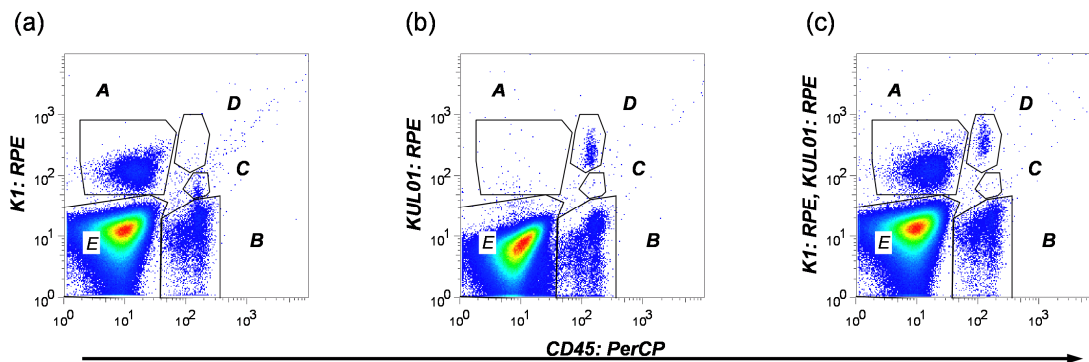


Abb. 18:
Färbung von Hühnerblut mit
(a) K1-RPE und α CD45-PerCP
(b) KUL01-RPE und α CD45-PerCP
(c) K1-RPE, KUL01-RPE und α CD45-PerCP

5.13.2 B-Zell-Marker

5.13.2.1 L-Kette

Da das Hybridom 2G1 zur Produktion eines α L-Kette-mAK im Heimatinstitut zur Verfügung stand, wurde zunächst dieser Antikörper getestet. Der Antikörper wurde mit FITC konjugiert. Bei der Titration auf verdünntem Blut war die Färbung jedoch unzureichend. In keiner Verdünnungsstufe gelang die Darstellung einer positiven Population.

5.13.2.2 BU1

Als weiterer B-Lymphozytenmarker wurde der Antikörper BU1-FITC (Klon AV20) getestet. In der Titration am Vollblut waren in allen \log_2 Verdünnungsstufen von 1/25 bis 1/1600 positive und negative Population eindeutig voneinander getrennt (Abb. 19). In den niedrigeren Verdünnungsstufen zeigte sich aber eine deutliche unspezifische Färbung der negativen Population. Bei der Wahl der für die folgenden Mehrfachfärbungen optimalen Konzentration galt es nun abzuwägen zwischen:

bestmöglicher Abgrenzbarkeit zwischen positiver und negativer Population.
(1/100, 1/200) zur sicheren Identifizierung der B-Zellen

und möglichst niedrigem Hintergrundrauschen der negativen Population.(1/800 bis 1/3200) wegen der möglichen störenden Auswirkungen in Mehrfachfärbungen z.B. mit schwach färbenden Lymphozytenmarkern wie dem α CD3-FITC

Es wurde entschieden, den Antikörper bis auf weiteres in der Konzentration 1/800 einzusetzen.

Ergebnisse

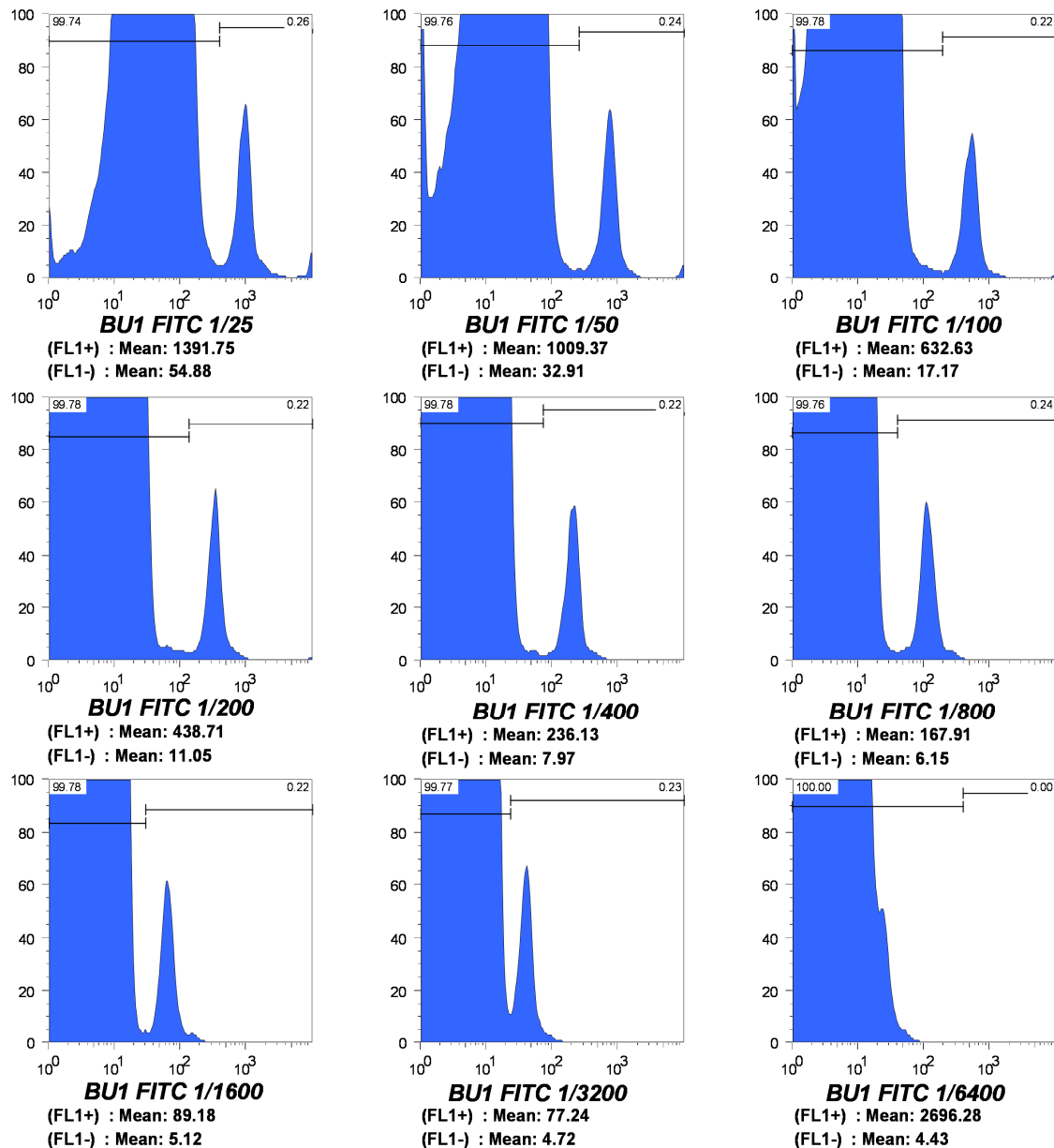


Abb. 19:
Titration BU1-FITC

5.13.3 T-Zell-Marker

Nachdem ein B-Zellmarker mit ausgezeichneten Färbereigenschaften gefunden worden war, sollten nun verschiedene T-Zellmarker auf ihre Qualitäten in der Vollblutfärbung getestet werden.

5.13.4 T-Lymphozytenfärbung mit α CD3-FITC

Zunächst sollte versucht werden die Summe der T-Lymphozyten mit einem FITC konjugierten α CD3 (Klon CT3) darzustellen. In der Kombination mit α CD45-PerCP gelang dies in Form einer großen in FL1-H positiven Population im gate A (Abb. 20 a). Es kam bei den Wiederholungsexperimenten jedoch immer wieder vor dass,

Ergebnisse

trotz identischem Färbeprotokoll diese Population deutlich niedrigere MFI aufwies. Abb. 20 zeigt eine solche Färbung bei der die Population der CD3-positiven Zellen teilweise ausserhalb des aus Abb. 20 a übernommenen gates zu liegen kommt und nicht eindeutig von der negativen Population abzugrenzen ist. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die α CD3-FITC-Färbung keine zuverlässige und reproduzierbare Identifikation der T-Lymphozyten erlaubt. Darum sollten nun weitere Lymphozytenmarker getestet werden.

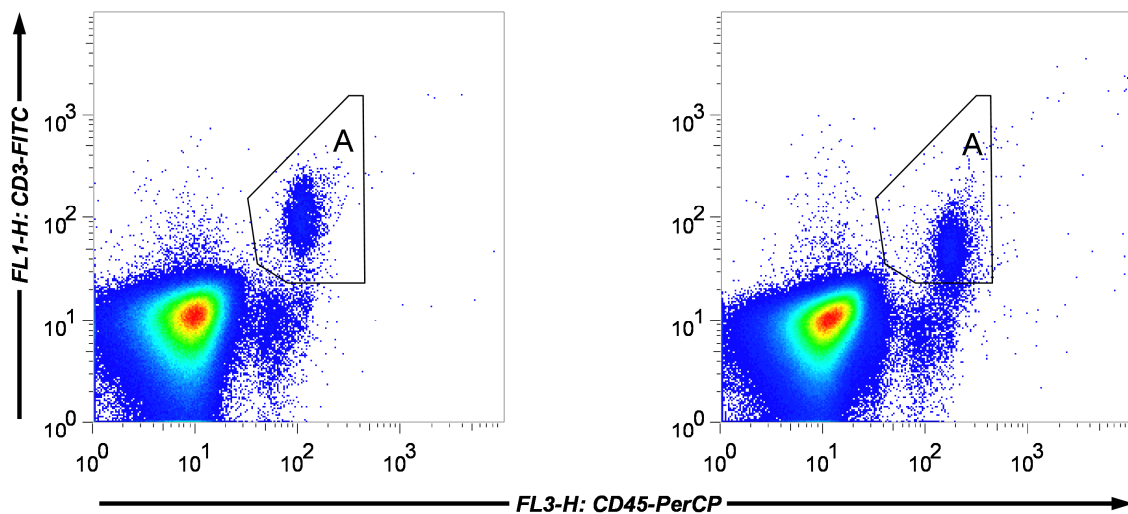


Abb. 20:
Färbungen von Hühnerblut mit α CD45-PerCP/ α CD3-FITC

5.13.4.1 T-Lymphozytenfärbung mit α CD4-FITC

Ein α CD4-FITC-Konjugat war bereits am Anfang der Studien erfolgreich auf seine Tauglichkeit für Vollblutfärbungen getestet worden (Abb. 8). Eine nochmalige Titration des Klons CT4 ergab eine optimale Verdünnung von ca 1/2500. Mit dem CT4-FITC war also ein sehr stark färbender Marker für T-Lymphozytenmarker identifiziert worden. Da dieser jedoch nur mit den CD4⁺-T-Lymphozyten nur einen Teil der T-Lymphozyten detektiert wurde geprüft, ob ergänzend ein α CD8-FITC in der Vollblutfärbung zum Einsatz kommen könnte.

5.13.4.2 T-Lymphozytenfärbung mit α CD8

5.13.4.2.1 α CD8 α (3-298)

Zunächst wurde ein α CD8 α -FITC-Konjugat (Klon 3-298) getestet. Da jedoch wiederholt starke unspezifische Färbungen auftraten (Abb. 21), wurde das Konjugat als ungeeignet beurteilt und beschlossen auf weitere Marker zu testen.

5.13.4.2.2 α CD8 α (CT8)

Deshalb wurde ein α CD8-FITC-Konjugat (Klon CT8) austitriert. Der Antikörper stellte sich als stark färbender unkomplizierter Marker dar, der selbst bei einer Verdünnung von 1/2500 optimale Färberesultate liefert.

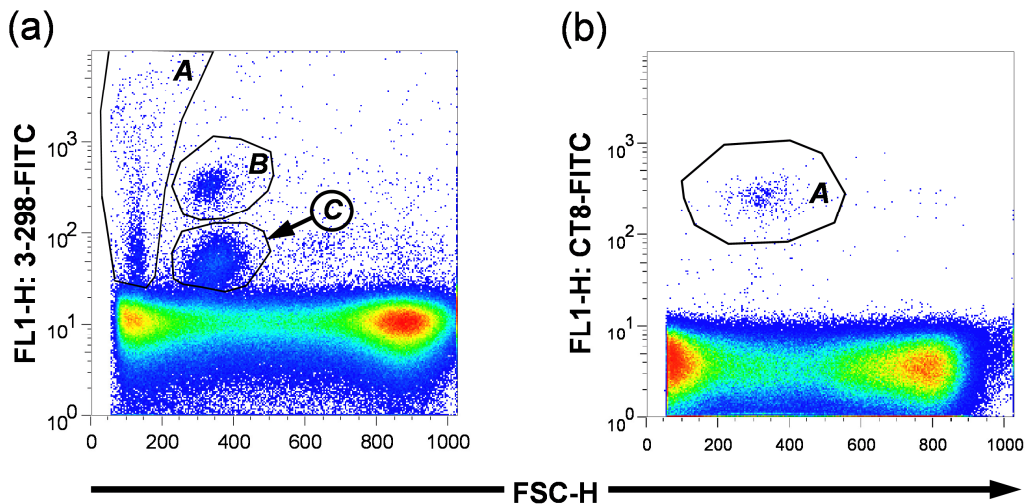


Abb. 21:

Färbung von Hühnerblut mit zwei verschiedenen α CD8 α -Markern

a: Färbung mit 3-298-FITC; unspezifisch gefärbte Populationen A und C; spezifisch gefärbte Population B

b: Färbung mit CT8-FITC; spezifisch gefärbte Population A; keine unspezifischen Färbungen

5.13.4.3 Mehrfachfärbung mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α FITC, BU1-FITC

Nun sollte überprüft werden, ob durch den kombinierten Einsatz der Antikörper α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC in einer einzigen Färbung Leukozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und die Summe der übrigen Leukozyten identifiziert werden können. In der FL3-H/FL2-H Darstellung (Abb. 22 a) lassen sich tatsächlich Thrombozyten (A), Monozyten (B), und übrige Leukozyten (C) separat ansprechen. Bei der Übertragung der Population C in eine FL3-H/FL2-H Darstellung (Abb. 22 b) werden eine zunächst nicht weiter differenzierte Population G und drei nahe beieinander liegende, für die eingesetzten Lymphozytenmarker positive Populationen D, E und F sichtbar. Zur näheren Identifikation dieser Populationen wurden diese getrennt von den übrigen Ereignissen ausgewertet (Abb. 22 c) und in ein dreifarbiges FL1-H-Histogramm-Overlay (Abb. 22 e) übertragen. Diesem wurden mit den einzelnen Lymphozytenmarkern durchgeführte Kontrollfärbungen ebenfalls als dreifarbiges FL1-H-Histogramm-Overlay (Abb. 22 d) gegenübergestellt. Beim Vergleich ist zu

Ergebnisse

erkennen: D entspricht der BU1⁺ Population (B-Lymphozyten), E den CD8α⁺ T-Lymphozyten und F den CD4⁺ T-Lymphozyten. Folglich konnten die verschiedenen Lymphozytenpopulationen differenziert werden, obwohl die betreffenden Marker alle mit dem gleichen Fluorochrom FITC konjugiert sind. Dafür verantwortlich sind die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Einzelpopulationen in den Kanälen FL1-H und FL3-H.

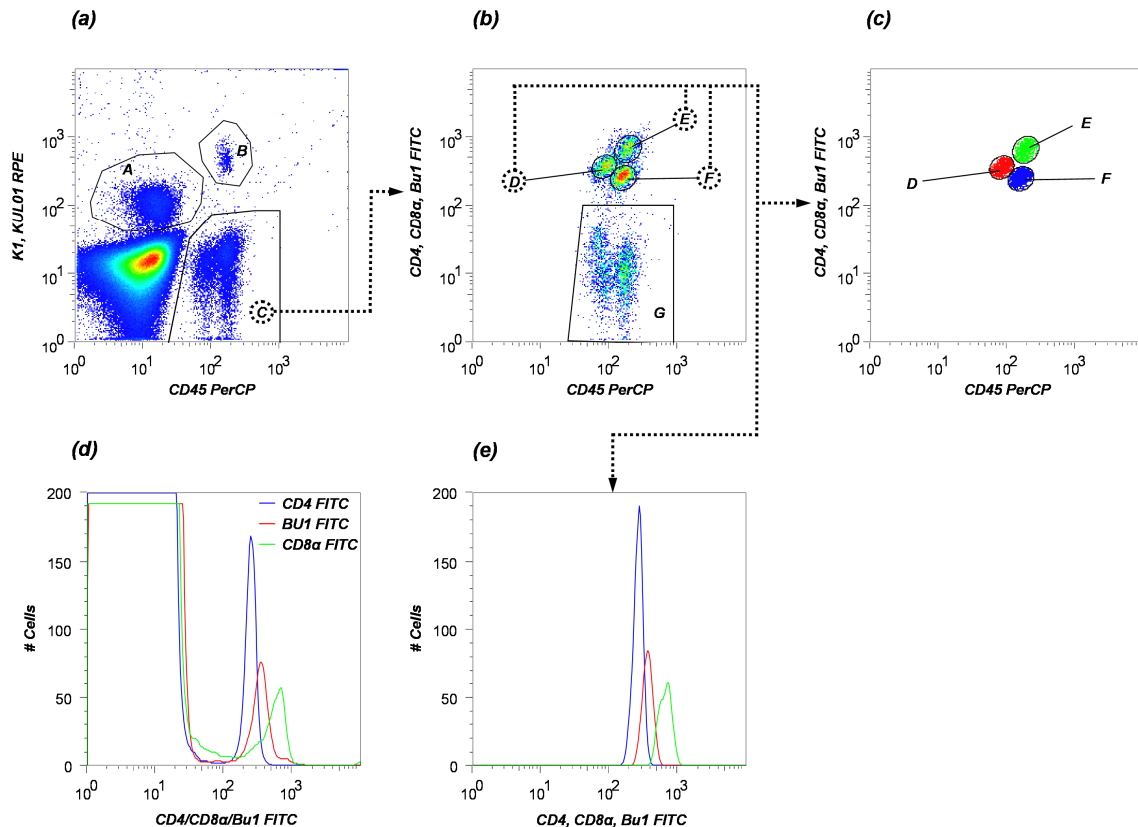


Abb. 22:

a, b, c, e: Färbung von Hühnerblut mit αCD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, αCD4-FITC, αCD8αFITC, BU1-FITC

d: Overlay aus Einzelfärbungen von Hühnerblut mit αCD4-FITC, αCD8αFITC und BU1-FITC

Zur Identifikation weiterer Leukozytensubpopulationen wurde die Population G (Abb. 22b, Abb. 23 b) eingehender untersucht. Die bereits in der FL3-H/FL2-H Darstellung (Abb. 23 c) angedeutete Teilung in zwei Subpopulationen H und I mit unterschiedlicher FL3-H-Intensität wird in der FL3-H-Histogrammdarstellung (Abb. 23 d) noch deutlicher. Durch die Übertragung der Population H in ein FSC-H/SSC-H-plot (Abb. 23 e) zerfällt diese in drei weitere Subpopulationen M, N und O. Die Population I zeigt sich in dieser Darstellungsform als eine homogene Population P (Abb. 23 f). Die Abb. 23 g bis m ermöglichen einen Vergleich der FSC-H/SSC-H-Charakteristika der fraglichen Population mit denen der bereits identifizierten

Ergebnisse

Leukozytenpopulationen. Die Position der Population P (Abb. 23 f) ist identisch mit der der Populationen D, E und F (Abb. 23 g,h,i,k). Demgegenüber weist die Thrombozytenpopulation A (Abb. 23 l) eine größere Streuung auf und die Monozyten B haben höhere FSC-H-Werte (Abb. 23 m). Dass die MFI der fraglichen Population für CD45-PerCP ähnlich der MFI der Populationen D (Bu1⁺), E (CD4⁺) und F (CD8⁺) ist, deutet daraufhin, dass es sich bei der fraglichen Population I bzw L/P um Lymphozyten oder lymphozytenartige Zellen mit den Charakteristika: CD45-PerCP⁺, K1-RPE⁻, KUL01-RPE⁻, CD4⁻, CD8α⁻, BU1⁻ handelt.

Ergebnisse

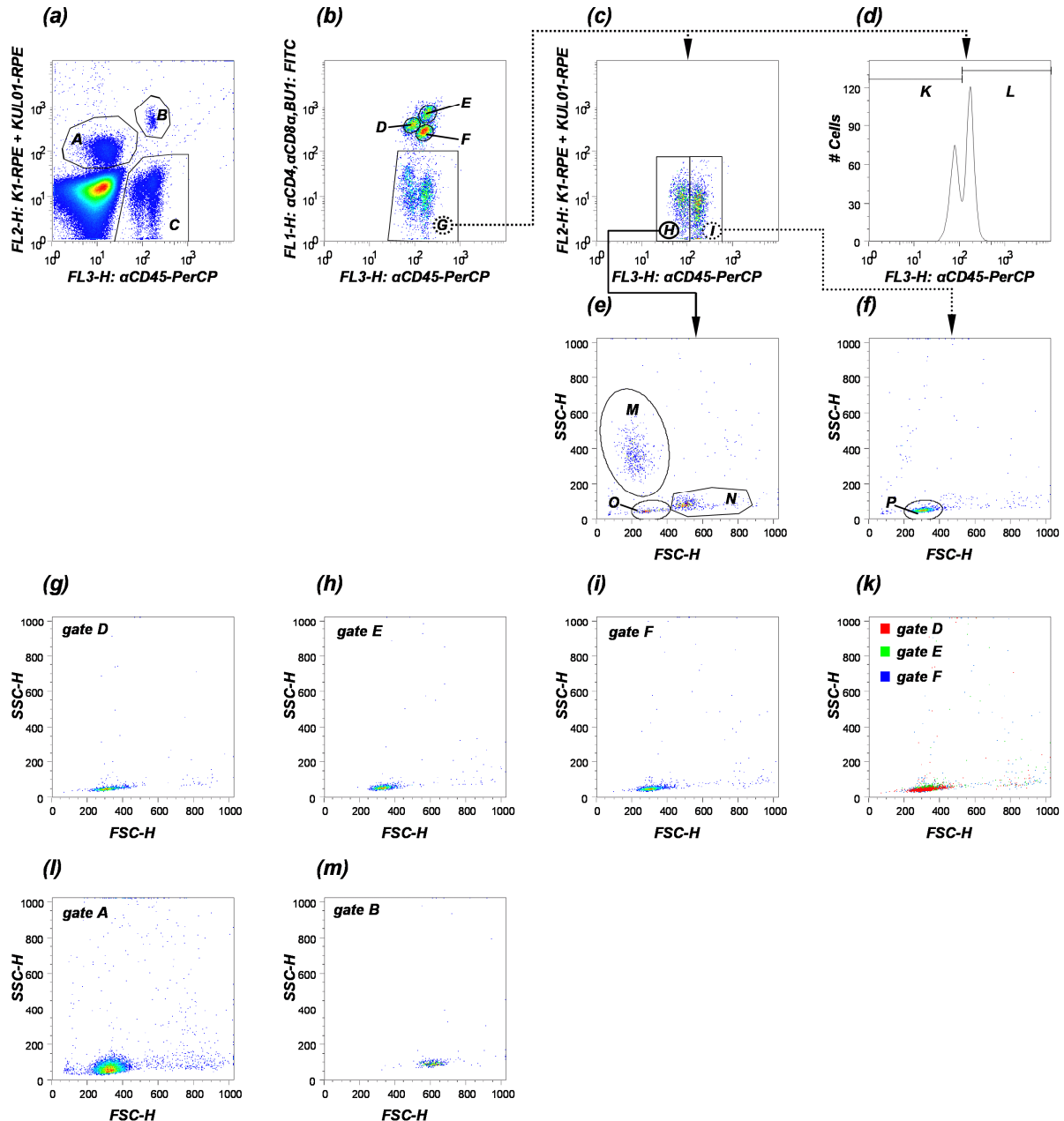


Abb. 23:
Färbung von Hühnerblut mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8a-FITC, BU1-FITC

Charakterisierung der CD45-PerCP^+ , K1-RPE^- , KUL01-RPE^- , CD4^- , CD8a^- , BU1^- Population

Um die fraglichen Zellen genauer zu charakterisieren wurden weitere Lymphozytenmarker in der Mehrfachfärbung mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE getestet. Die Antikörper $\alpha\text{TCR}\gamma\delta$ -FITC und $\alpha\text{TCR}\alpha\beta(\text{V}\beta_1)$ -FITC färbten dabei ausreichend stark um eine für den jeweiligen Marker positive Population deutlich abgrenzbar von den restlichen Leukozyten darstellbar zu machen (Abb. 24 b und c). Die $\alpha\text{TCR}\alpha\beta(\text{V}\beta_2)$ -Färbung erlaubt allerdings keine ausreichend deutliche

Ergebnisse

Abgrenzung zwischen der FL1-H/FL3-H-doppelpositiven Population konnte und der FL1-H⁻/FL3-H⁺-Population (Abb. 24 i). Zudem sind FL3-H negative FL1-H positive Ereignisse vorhanden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Antikörper tote Zellen anfärbt. Damit war klar, dass die Kombination der Antikörper $\alpha\text{TCR}\gamma\delta\text{-FITC}$, $\alpha\text{TCR}\alpha\beta(\text{V}\beta_1)\text{-FITC}$ und $\alpha\text{TCR}\alpha\beta(\text{V}\beta_2)$ nicht geeignet sein würde um die Summe aller T-Lymphozyten markieren zu können. Aus dem Experiment lässt sich eine weitere wichtige Information ableiten: In Abb. 24 a ist zu erkennen, dass beinahe alle für CD45 hoch positiven Zellen (Lymphozyten und Monozyten) gleichzeitig CD3 positiv sind. Dies legt bereits die Vermutung nahe, dass sich darunter auch die fragliche lymphozytenartige Population mit den Charakteristika CD45-PerCP⁺, K1-RPE⁻, KUL01-RPE⁻, CD4⁻, CD8a⁻, BU1⁻ befinden könnte. Sollte dies tatsächlich der Fall sein konnte davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um eine Lymphozytensubpopulation handelte.

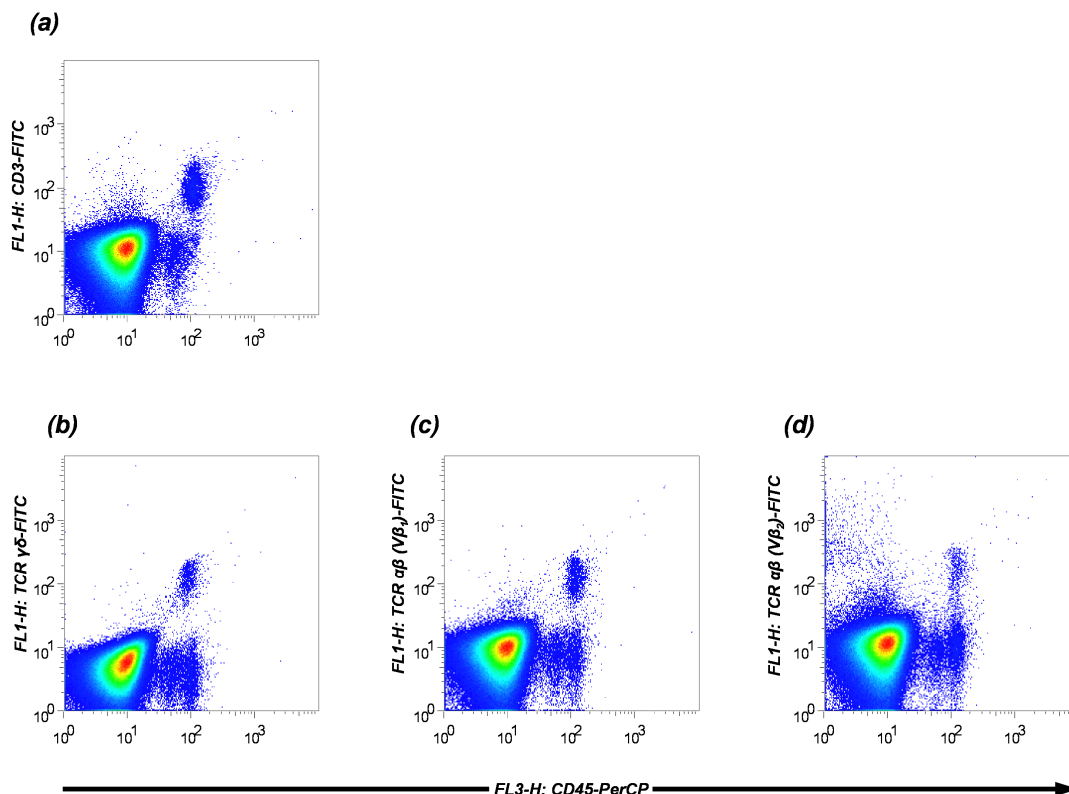


Abb. 24:
Durchflusszytometrische Färbungen von Hühnerblut mit $\alpha\text{CD45-PerCP}$ und jeweils einem Lymphozytenmarker

5.13.4.4 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Zur weiteren Abklärung kamen deshalb nun verschiedene Kombinationen von Lymphozytenmarkern zum Einsatz. Als Basiskomponenten wurden in jeder Färbung

Ergebnisse

wieder die Antikörper α CD45-PerCP, K1-RPE und KUL01-RPE, verwendet. Zusätzlich wurden ein oder mehrere Lymphozytenmarker hinzugegeben (Tab. 3). Bei der Auswertung der Mehrfachfärbungen sollten nun die relativen Zahlen für verschiedene Lymphozytenpopulationen ermittelt werden, um weitere Aufschlüsse über die Charakteristika der fraglichen Population zu erhalten.

Dazu wurden mit der Population C zunächst die für α CD45-PerCP positiven und zugleich für K1 und KUL01 negativen Zellen ausgewählt. Diese Population wurde in zwei weitere Populationen aufgeteilt. Eine davon ist positiv für die in der jeweiligen Färbung eingesetzte Lymphozytenmarkerkombination (F) die andere negativ (H). Um störende Ereignisse und die Granulozyten (L) auszusortieren, wurden aus den Populationen F und H mit (I) und (K) diejenigen Zellen ausgewählt, die innerhalb eines Lymphozytengates in der FSC-H/SSC-H-Darstellung lagen. Nun konnte für jede Färbung ermittelt werden, welcher Prozentsatz an Lymphozyten positiv bzw. negativ für den/die jeweils eingesetzten Lymphozyten-Marker war.

Die Resultate dieser Untersuchung sind in Tab. 3 dargestellt.

Mit 29,5% bzw. 28,5% sind etwa gleich viele Lymphozyten negativ für die Kombination α CD4/ α CD8 β /BU1 wie für α CD4/ α CD8 α /BU1. Auch für die Kombination α CD4/ α CD8 α / α CD8 β /BU1 waren mit 29,5% ebenso viele Lymphozyten negativ. Daraus ergibt sich, dass es bei der eingesetzten Antikörper-Kombination keine Rolle spielt, ob α CD8 β oder α CD8 α Verwendung findet.

Demgegenüber werden durch die Kombination α CD4/ α CD8 β /BU1/ α CD3 lediglich 5,6% der Lymphozyten nicht erfasst. Dies bedeutet, dass rund 24% der Lymphozyten positiv für CD3 aber negativ für α CD4/ α CD8 α / α CD8 β /BU1 sind.

Rechnerisch waren mit 24% also genauso viele Lymphozyten der Population CD3⁺/ α CD4⁻/ α CD8 α ⁻/ α CD8 β ⁻/Bu1⁻ zuzuordnen wie der Population α TCR $\gamma\delta$ ⁺/ α CD4⁻/ α CD8 α ⁻/ α CD8 β ⁻/Bu1⁻. Die Färbung mit α TCR $\gamma\delta$ als einzigem Lymphozytenmarker erbrachte tatsächlich einen Wert von 23,6% α TCR $\gamma\delta$ -FITC positiven Lymphozyten.

Damit war gezeigt, dass unter allen eingesetzten Lymphozytenmarkern nur α CD3 und α TCR $\gamma\delta$ die fragliche Population anfärbten. Zudem waren die Zellen eindeutig als $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten charakterisiert. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit rund 24% einen beachtlichen Anteil der Lymphozyten ausmachen können und bei der Auswahl für das Differentialblutbild einzusetzenden Antikörper unbedingt zu berücksichtigen sind. Im Gegensatz zu den teilweise unzureichenden Färbeeigenschaften des α CD3-FITC färbte α TCR $\gamma\delta$ -FITC stets

Ergebnisse

ausreichend stark und war damit als der geeignetere Marker für diesen Zelltyp identifiziert.

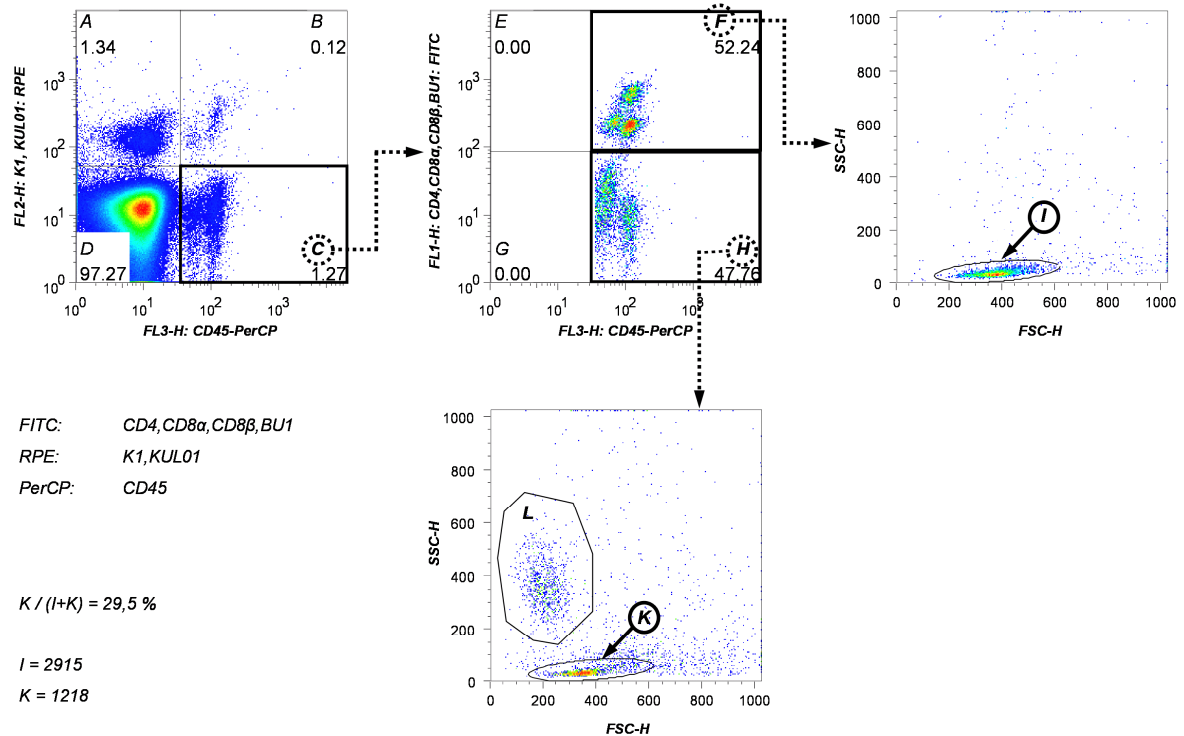


Abb. 25:
Färbung von Hühnerblut mit αCD45-PerCP, K1-RPE und KUL01-RPE sowie den Lymphozytenmarkern αCD4/αCD8α/ αCD8β/BU1

Färbung	FITC-konjugierte Lymphozytenmarker						Lymphozyten	
	αCD4	αCD8α	αCD8β	αCD3	αTCRγδ	BU1	FL1-H positiv	FL1-H negativ
1	✓		✓			✓	70,5%	29,5%
2	✓	✓				✓	71,5%	28,5%
3	✓		✓		✓	✓	94,4%	5,6%
4					✓		23,6%	76,4%
5	✓	✓	✓			✓	70,5%	29,5%
6	✓		✓	✓		✓	94,4%	5,6%

✓: in der Färbung vorhanden

Tab. 3:
Anteile FL1-H positiver und negativer Lymphozyten nach Färbung mit verschiedenen Kombinationen FITC-konjugierter Lymphozytenmarker

Die vorhandenen Hinweise darauf, dass die γδ-T-Lymphozyten des Huhnes negativ für die Marker CD4 und CD8 sind, sollten abschließend experimentell verifiziert werden. Dazu wurden mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnene

Ergebnisse

PBMCs mit Direktkonjugaten gefärbt. Im in der FSC-H/SSC-H Darstellung festgelegten „Lymphozytengate“, das in der Regel zu einem hohen Prozentsatz auch Thrombozyten enthält, befinden sich in der Auswertung in Abb. 26 ca. 4,1% $CD8\alpha^+$, 10,6% $CD4^+$ und 4,1% $TCR\gamma\delta^+$ Zellen. Etwa 0,5% der Zellen sind dabei $CD8\alpha^+/TCR\gamma\delta^+$ doppelt positiv. Damit sind in der untersuchten Probe ca. 22,4% der festgestellten T-Lymphozyten $TCR\gamma\delta^+$ und 19,7% $TCR\gamma\delta^+/CD8\alpha^-/CD4^-$. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie der im Vollblut experimentell ermittelte Anteil von 23,6% $TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen an den Gesamt-Lymphozyten (Tab. 39). Dies bestätigte die obigen Ergebnisse (5.13.4.4, Abb. 25, Tab. 3) und die dort getroffene Entscheidung $\alpha TCR\gamma\delta^+$ in das Färbeprotokoll zur Leukozytendifferenzierung mitaufzunehmen.

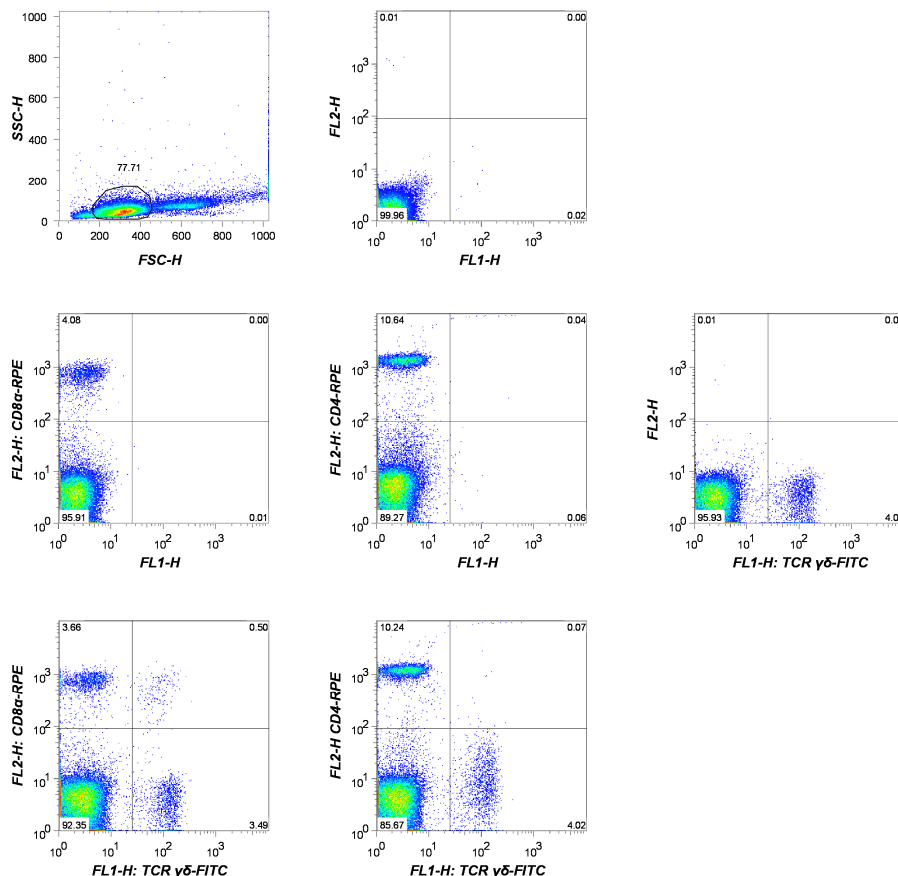


Abb. 26:
Einfach- und Doppelfärbungen von PBMC mit den Lymphozytenmarkern $\alpha CD4RPE/\alpha CD8\alpha RPE/\alpha TCR\gamma\delta$ -FITC

5.13.4.5 Mehrfachfärbung mit $\alpha CD45$ -PerCP, $\alpha CD4$ -FITC, $\alpha CD8\alpha$ -FITC, BU1-FITC, $\alpha TCR\gamma\delta$ -FITC

Nach den bisherigen Ergebnissen war zu erwarten, dass eine kombinierte Färbung mit den Antikörpern $\alpha CD4/\alpha CD8\alpha/BU1/\alpha TCR\gamma\delta$ alle Lymphozyten erfassen könnte.

Ergebnisse

Abb. 27 zeigt die Auswertung der Messung einer Blutprobe die gleichzeitig mit α CD45-PerCP, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC und α TCR $\gamma\delta$ -FITC gefärbt wurde. Die Lymphozyten (A und B) sind deutlich von den anderen Zellen separiert. Zudem kann klar zwischen den B-Lymphozyten (A) und den T-Lymphozyten (B) unterschieden werden.

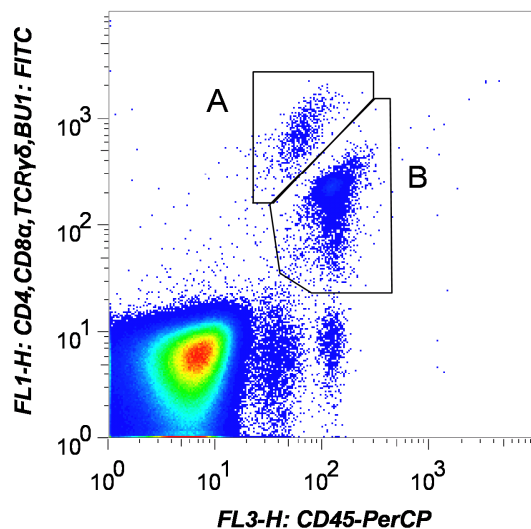


Abb. 27:
Färbung von Hühnerblut: α CD45-PerCP/ α CD4-FITC/ α CD8 α -FITC/BU1-FITC/ α TCR $\gamma\delta$ -FITC
A: B-Lymphozyten; B: T-Lymphozyten

5.13.4.6 Lymphozytenmarker α CD5

Die nun etablierte Färbung zur Darstellung aller Lymphozyten sah also den kombinierten Einsatz der vier Antikörper α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC und BU1-FITC vor. Im Folgenden sollte deshalb geprüft werden, ob dieser „Antikörpercocktail“ im Sinne einer Vereinfachung der Mehrfachfärbung vollständig oder teilweise durch eine Art „Panlymphozytenmarker“ ersetzt werden könnte. Dazu wurde der Lymphozytenmarker α CD5 getestet. Neben der üblichen Vollblut-Titration zur Bestimmung der optimalen Konzentration wurde der α CD5-FITC auch in Doppelfärbungen eingesetzt, um zu überprüfen, mit welchen Lymphozytenpopulationen der Antikörper reagiert. Abb. 28 zeigt die Ergebnisse. Aus einer α CD4-RPE Färbung wurden in der FL1-H/FL2-H-Darstellung (a) die CD4 $^{+}$ -Zellen als Population A in ein FSC-H/SSC-H-plot (b) übertragen. Um diese Population wurde ein Lymphozytengate B gelegt. Um bei der Auswertung einen Großteil der Erythrozyten zu eliminieren, wurden bei der Analyse der folgenden Messungen nur die Ereignisse in Betracht gezogen, die in der FSC-H/SSC-H-

Ergebnisse

Darstellung innerhalb dieses Lymphozytengates lagen (c). Der untenstehenden Abbildung kann entnommen werden, dass alle $CD4^{hoch+}$ -Zellen auch $CD5^+$ sind (g). Ein Teil der $CD8^{hoch+}$ Zellen (Population K) ist aber $CD5^-$ (k). Zudem erweisen sich die B-Lymphozyten (Population G) allenfalls als schwach positiv für $CD5$ (i). Damit war gezeigt, dass mit $\alpha CD5$ -FITC weder die B-Lymphozyten, noch alle T-Lymphozyten dargestellt werden konnten. Zudem färbte $\alpha CD5$ -FITC generell deutlich schwächer als beispielsweise $\alpha CD4$ -FITC und $\alpha CD8$ -FITC. Deshalb stand fest, dass $\alpha CD5$ -FITC die anderen Antikörper in der Vollblutfärbung nicht als Panleukozytemarker ersetzen konnte.

Aus den durchgeführten Messungen konnte aber eine weitere äußerst wichtige Information abgeleitet werden. In der $CD5$ -FITC/ $\alpha CD8\alpha$ -RPE Färbung (h) zeigte sich erstmals deutlich eine für $CD8\alpha$ schwach positive Population E, die bei den bisherigen Untersuchungen nicht nachzuweisen war. In dieser Doppelfärbung sind für $\alpha CD8\alpha$ stark positive (C und D), schwach positive (E) und negative Zellen (F) zu identifizieren. Es gibt jedoch keine Zellen die $CD5$ -positiv und gleichzeitig $CD4$ und $CD8$ -negativ sind (gate I) (k). Da also nahezu alle $CD5$ -positiven Zellen auch durch die Kombination $\alpha CD4/\alpha CD8\alpha$ stark angefärbt werden (k), müssen die Zellen, die $CD5^+/CD8^-$ (F) bzw. $CD5^+/CD8^{schwach+}$ (E) sind, zugleich hochpositiv für $\alpha CD4$ sein. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur vorhandenen Feststellung, dass die für $\alpha CD8\alpha$ schwach positiven $CD8\alpha\alpha$ T-Lymphozyten des Huhnes zugleich positiv für $\alpha CD4$ sind (Burgess and Davison 1999). Somit war damit gezeigt, dass beim kombinierten Einsatz von $\alpha CD4$ und $\alpha CD8\alpha$ sowohl $CD8\alpha\alpha$ - als auch $CD8\alpha\beta$ -T-Lymphozyten von mindestens einem Lymphozytenmarker stark angefärbt und damit auch als Lymphozyten identifiziert würden.

Folglich wurde beschlossen, $\alpha CD5$ -FITC nicht mehr einzusetzen und bis auf weiteres die Kombination der vier Antikörper $\alpha CD4$, $\alpha CD8\alpha$, $\alpha TCR\gamma\delta$ und BU1 weiter zur Lymphozytendarstellung zu verwenden.

Ergebnisse

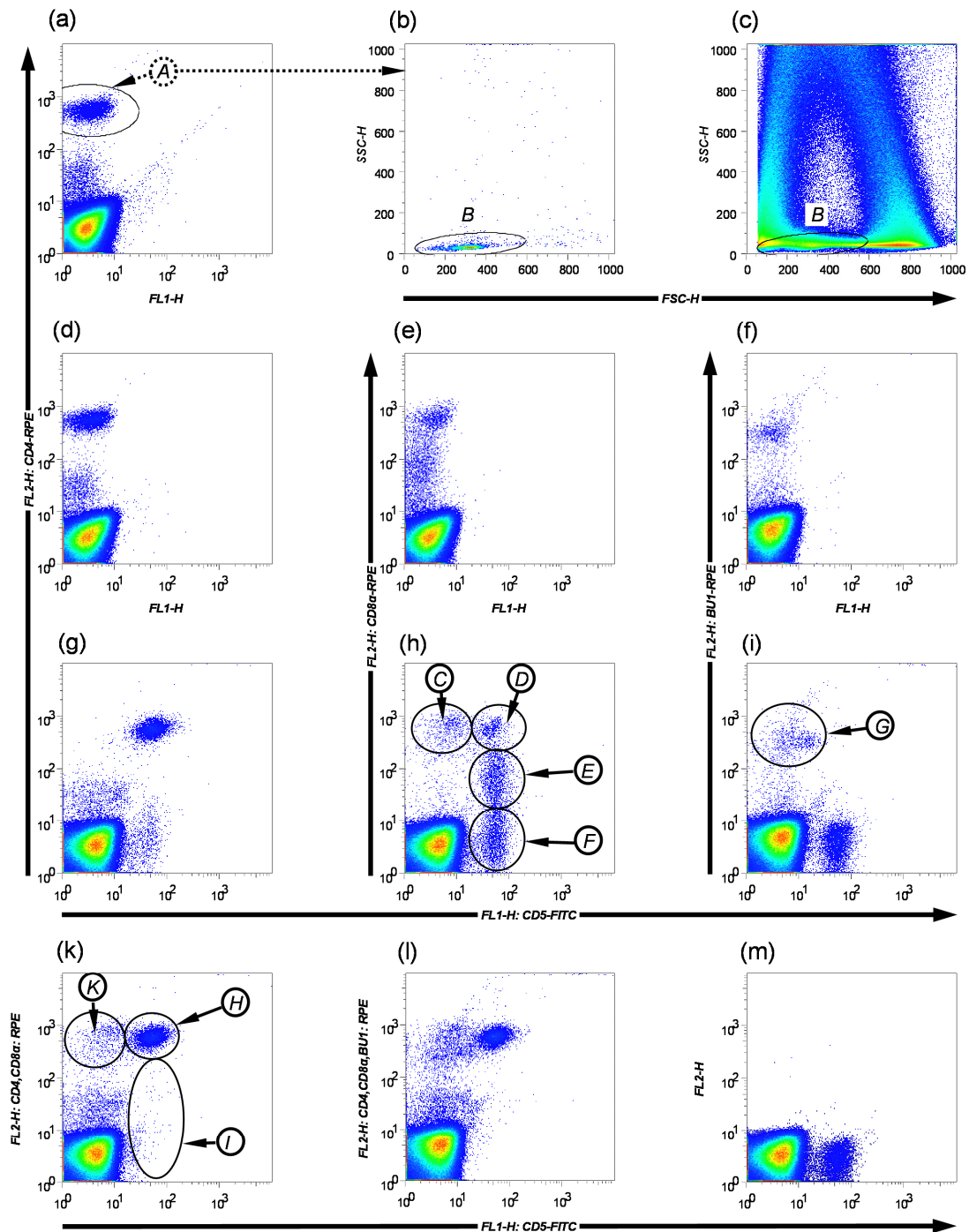


Abb. 28:

Färbung von Hühnerblut: Einzel- und Doppelfärbungen von α CD4RPE, α CD8 α RPE, BU1RPE und α CD5FITC

5.13.4.7 Mehrfachfärbung mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC

Die unter 5.13.4.3 beschriebene Färbung wurde nun um α TCR $\gamma\delta$ -FITC ergänzt. Es wurde nun überprüft, ob durch den kombinierten Einsatz der Antikörper α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC und α TCR $\gamma\delta$ -

Ergebnisse

FITC in einer einzigen Färbung Leukozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und die Summe der übrigen Leukozyten identifiziert werden können. Abb. 29 zeigt die Auswertung einer Blutprobe auf diese Weise gefärbten Blutprobe. In der FL3-H/FL2-H-Darstellung ist die Thrombozytenpopulation A, wie bereits aus anderen Färbungen bekannt, eindeutig abgegrenzt. Die CD45-PerCP hochpositiven Monozyten (L) kommen durch die KUL01-RPE-Färbung weit im FL3-H-positiven Bereich zu liegen. Während in dieser Darstellung die weiteren Subpopulationen der Leukozyten (B) nur ansatzweise identifiziert werden können, gelingt dies gut durch eine Übertragung in ein FL3-H/FL1-H-plot. Auch hier lassen sich wieder B-Lymphozyten (D) und T-Lymphozyten (E) getrennt erfassen. Im gate F befinden sich nur vereinzelte nicht eindeutig zuzuordnende CD45^{hoch+}-Ereignisse. Um die verbleibenden CD45-PerCP mittel-positiven Leukozyten (G) weiter zu klassifizieren, bietet sich die FSC-H/SSC-H-Darstellung (d) an. Hier lassen sich erneut drei Subpopulationen H, I und K erkennen. Aufgrund des später durchgeführten Vergleichs mit mikroskopischen Untersuchungen wurde die Population I im Nachhinein als Basophile Granulozyten identifiziert (Abb. 48, Abb. 49) und deshalb in den folgenden Abbildungen als diese bezeichnet. Wegen der hohen Granularität der Zellen und in Anlehnung an die Ergebnisse der im Zusammenhang mit der 3,3'-Dipentyloxacarbocyanine iodide (DiOC₅(3)-Färbung publizierten Arbeiten (Campbell 1995) und konnten die Population H als Heterophile Granulozyten angesprochen werden.

Damit war eine Färbung etabliert mit der nicht nur Gesamtleukozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, Heterophile Granulozyten, Basophile Granulozyten sondern auch noch B-Lymphozyten und T-Lymphozyten identifiziert werden konnten.

Ergebnisse

Abkürzung	Zielantigen	Klon	Fluorochrom	Isotyp	Gefärbte Zellen	Referenz	Verdünnung	erhältlich bei
α CD45-PerCP	CD45	16-6	PerCP	IgG2ak	Leukozyten, Thrombozyten	(Viertlboeck and Gobel, 2007)	1/6400	Eigenkonjugation
K1-RPE	unbekannt	K1	RPE	IgG2ak	Thrombozyten, Monozyten	(Kaspers et al., 1993)	1/6400	Eigenkonjugation
KUL01	unbekannt	KUL01	RPE	IgG1k	Monozyten	(Mast et al., 1998)	1/1600	SBA
α CD4-FITC	CD4	CT4	FITC	IgG1k	T-Helferzellen	(Chan et al., 1988)	1/5120	BC
α CD8 α -FITC	CD8 α	CT8	FITC	IgG1k	zytotox. T-Lymphozyten	(Chan et al., 1988)	1/2560	BC
α TCR $\gamma\delta$ -FITC	TCR $\gamma\delta$	TCR1	FITC	IgG1k	$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten	(Chen et al., 1988, Sowder et al. 1988)	1/640	SBA
BU1-FITC	BU1(chB6)	AV20	FITC	IgG1k	B-Lymphozyten	(Rothwell et al., 1996 Tregaskes, C.A. 1996)	1/400	SBA

Tab. 4:
Antikörper für die siebenfach-Vollblutfärbung

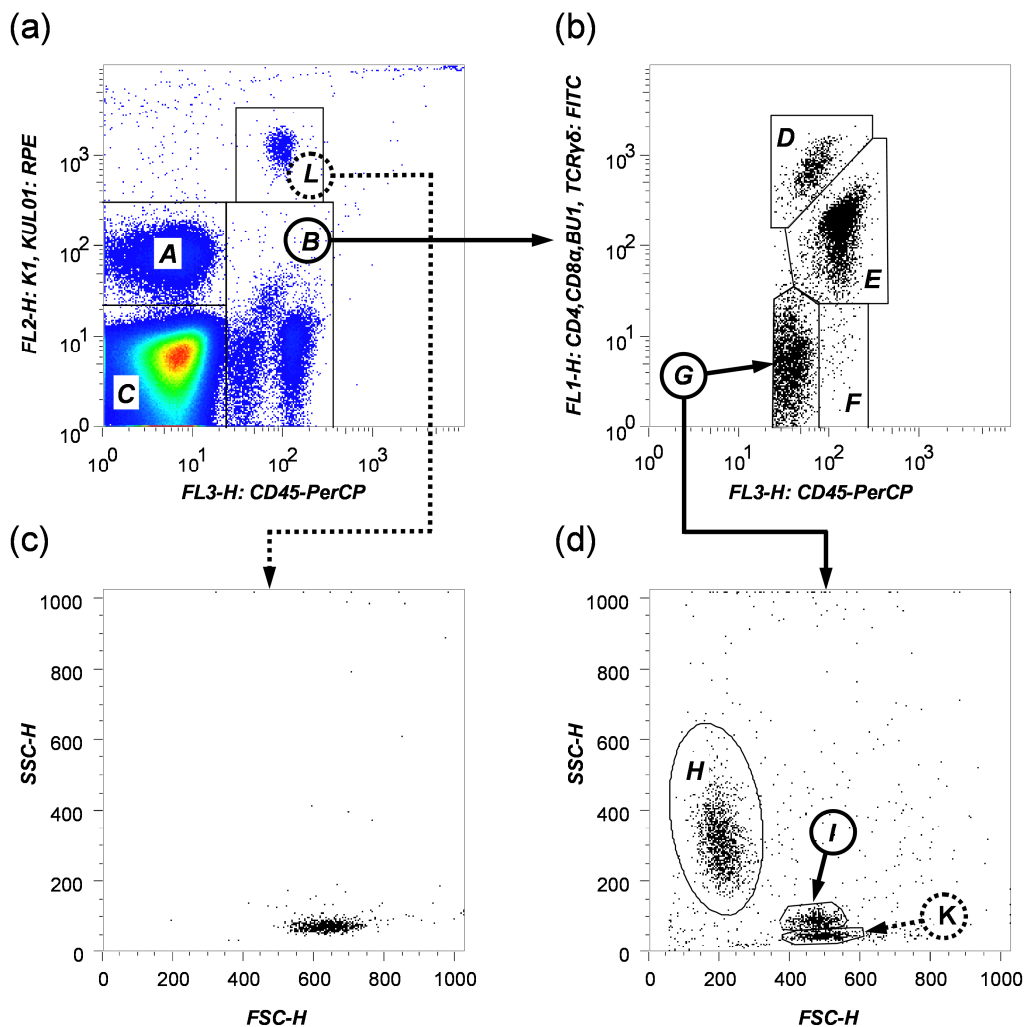


Abb. 29:
Färbung von Hühnerblut mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC
A: Thrombozyten, **B:** Leukozyten, **C:** Erythrozyten, **D:** B-Lymphozyten, **E:** T-Lymphozyten, **F:** nicht klassifizierte Leukozyten, **G:** verschiedene Leukozyten, **H:** Heterophile Granulozyten, **I:** Basophile Granulozyten, **K:** nicht klassifizierte Leukozyten

Ergebnisse

Abb. 30 unterstreicht die Plausibilität der durch die Färbung identifizierten Populationen durch die ihre Homogenität bezüglich ihrer jeweiligen FSC-H/SSC-H-Charakteristika.

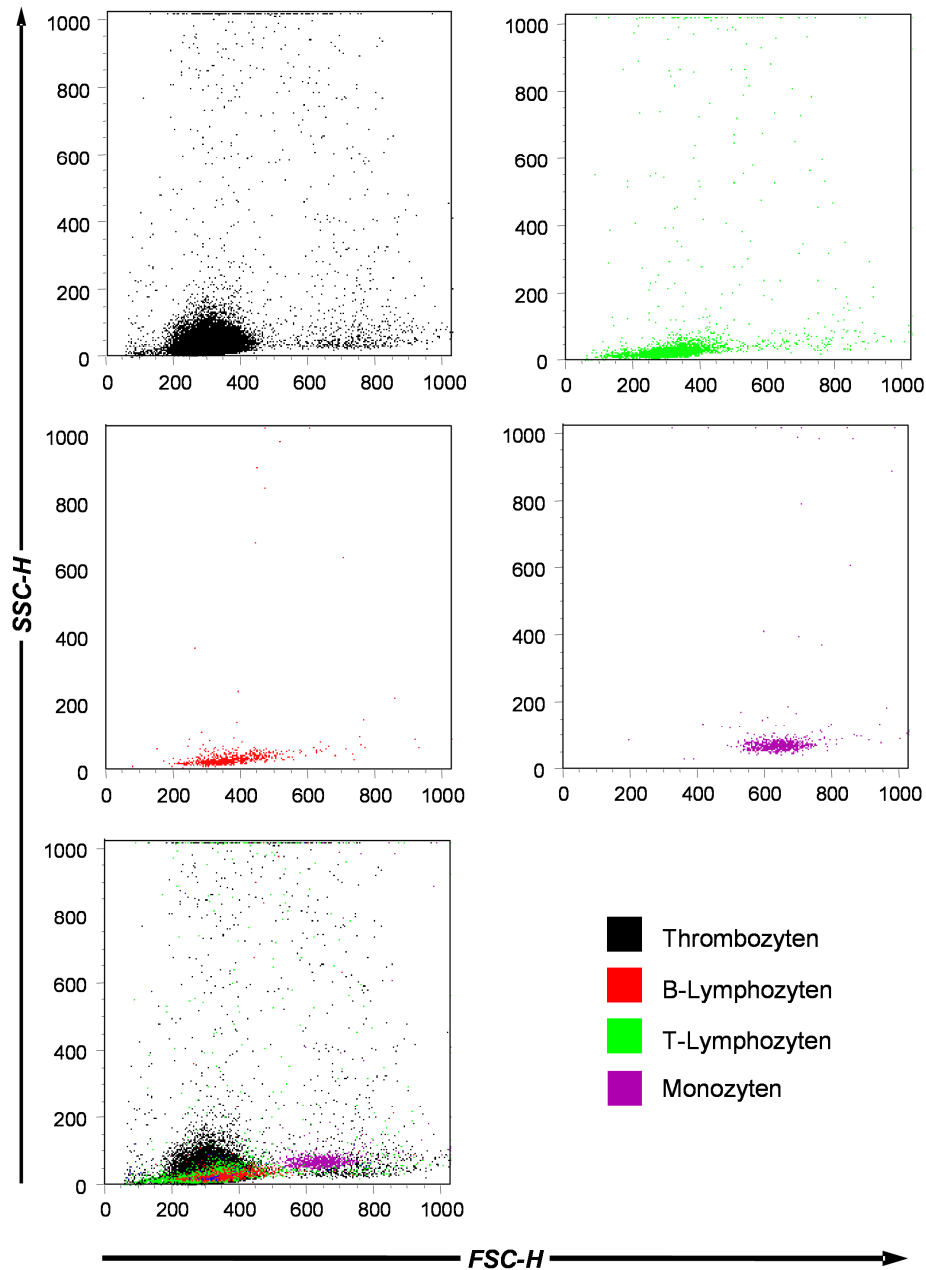


Abb. 30:
Färbung von Hühnerblut mit α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR γ δ -FITC; Darstellung der in Abb. 29 identifizierten Zellpopulationen

Ergebnisse

Zur umfassenden Dokumentation der Charakteristika der verschiedenen identifizierbaren Zellpopulationen wurde eine Tafel (Abb. 31) erstellt. Darin enthalten sind alle durch Permutation der Parameter FSC-H, SSC-H, FL1-H, FL2-H und FL3-H möglichen dotplot-Varianten der bereits aus Abb. 29 und Abb. 30 bekannten Messung. Die unterschiedlichen Zelltypen sind durch verschiedene Farben kenntlich gemacht. Dass alle Populationen in jeder möglichen Darstellung als natürlich wirkende Punktwolken in Erscheinung treten, spricht dafür, dass die angewandte Färbetechnik reell existierende Zellpopulationen identifiziert, die einerseits in allen Parametern in sich homogen sind und sich andererseits untereinander in mehreren Parametern unterscheiden.

Ergebnisse

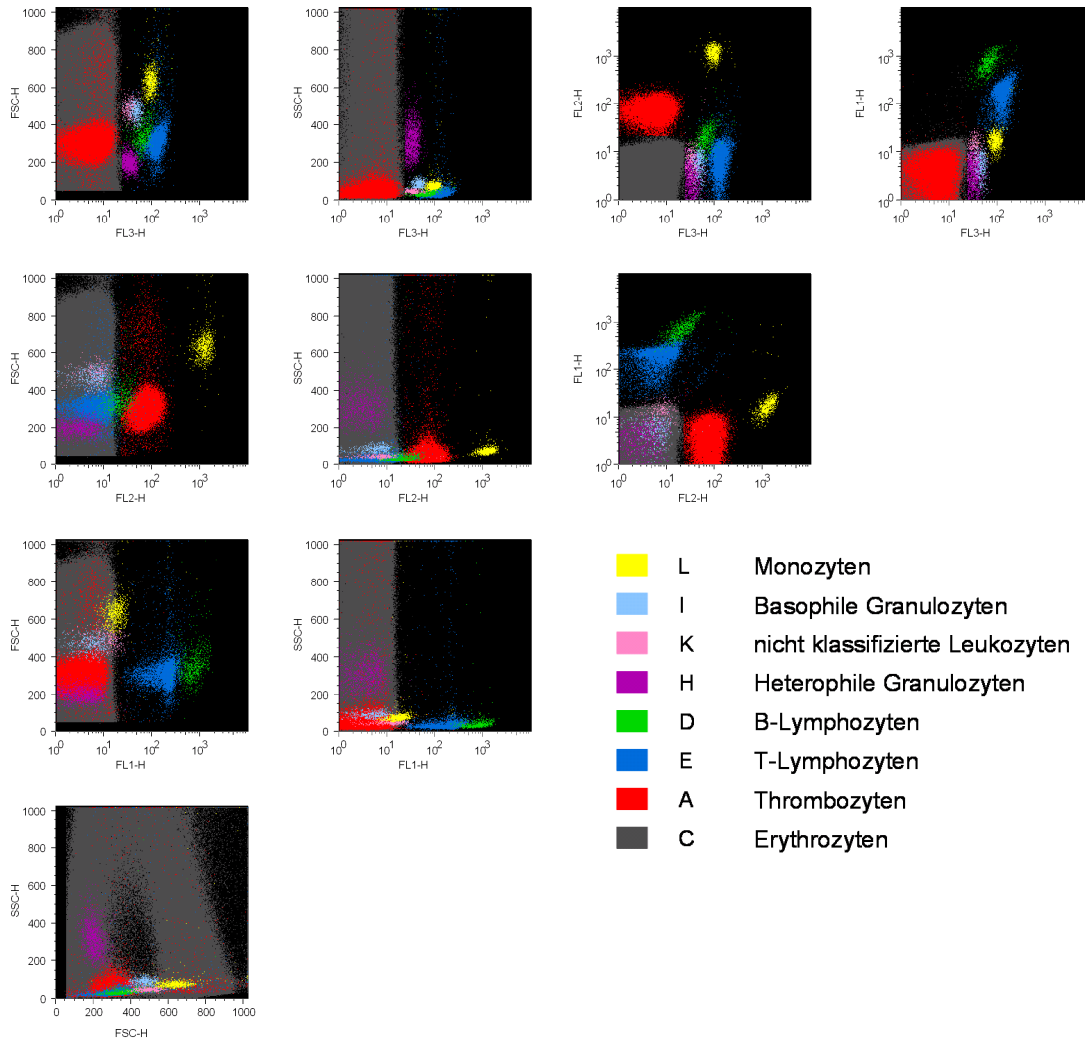


Abb. 31:
Darstellung der in Abb. 29 und Abb. 30 identifizierten Populationen in Vielfarb-Overlays; alle möglichen Permutationen der zweidimensionalen Darstellungen der Parameter FSC-H, SSC-H, FL1-H, FL2-H und FL3-H

5.13.4.8 α CD45SPRD

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob innerhalb der etablierten Färbung der selbst konjugierte α CD45-PerCP (Klon16-6) durch ein kommerziell erhältliches lichtstabileres α CD45-SPRD-Konjugat (Klon LT40) ersetzt werden könnte. Nachdem die optimale α CD45SPRD-Konzentration in einer Titration bestimmt worden war, wurde eine Blutprobe vergleichend gefärbt (Abb. 32). Grundsätzlich funktionierte die Färbung mit α CD45SPRD zwar. Die Trennung zwischen CD45 positiver (C) und CD45 negativer Population (D) war mit α CD45-SPRD aber wesentlich undeutlicher. Zudem war die bei der α CD45-PerCP-Färbung vorhandene Teilung der CD45 positiven Population C in eine mittel und eine hochpositive Fraktion in der Färbung mit α CD45-SPRD nicht zu erkennen (Abb. 32 a und c). Ferner waren die B-Lymphozyten ((Abb. 32 d) Population H) – möglicherweise aufgrund der stärkeren

Ergebnisse

Kompensation der Messung – nicht mehr als eigenständige Population zu erkennen (Abb. 32 b). Aufgrund seiner wesentlich besseren Färbeeigenschaften wurde deshalb bei allen weiteren Experimenten ausschließlich als Panleukozytenmarker α CD45-PerCP (Klon16-6) eingesetzt.

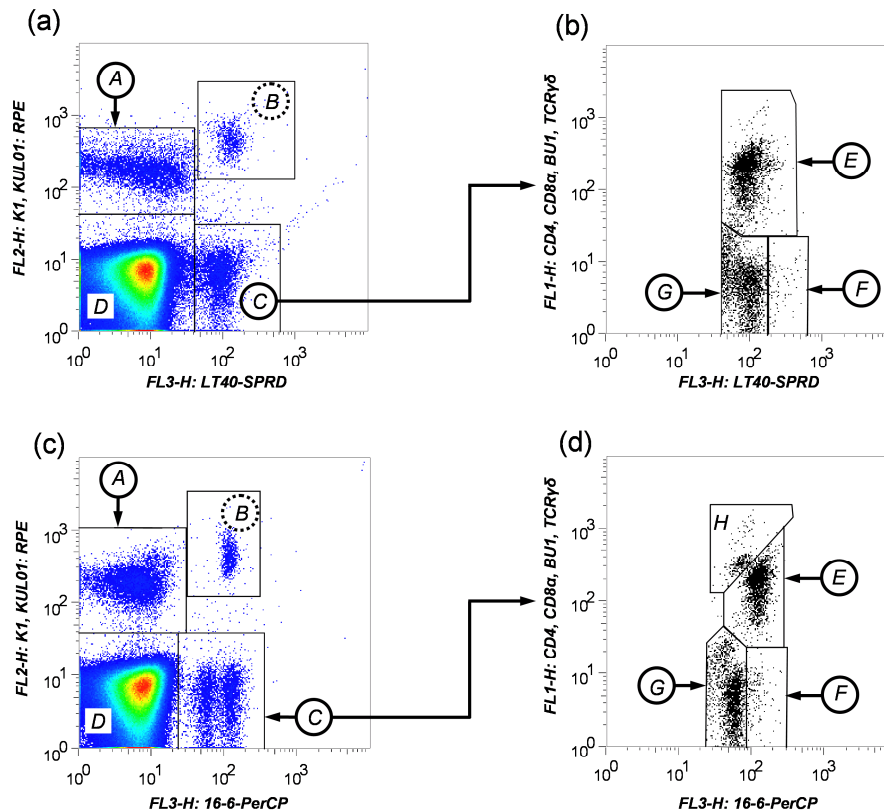


Abb. 32:
Färbung von Hühnerblut mit K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC sowie vergleichend mit den α CD45-Konjugaten: a) LT40-SPRD und b) 16-6-PerCP

5.14 Absolute Quantifizierung

5.14.1 Fluospheres polystyrene microspheres

Nachdem nun ein Verfahren etabliert worden war mit dem die Hühnerleukozyten dargestellt und differenziert werden konnten, sollte nun versucht werden die Zellen auch absolut zu quantifizieren. Dazu wurden verschiedene kommerziell erhältliche beads auf ihre Kompatibilität mit dem etablierten Verfahren geprüft.

Zunächst wurden die in der Literatur beschriebenen, Fluospheres polystyrene microspheres 15 μ m blue green fluorescent (430/465), Molecular Probes getestet. Die microspheres werden üblicherweise zur Blutflussbestimmung in Labortieren benutzt. In der Literatur ist aber beschrieben, dass sie sich auch zur Quantifizierung von Hühnerlymphozytenpopulationen einsetzen lassen (Böttcher 2006). Sowohl in

der durchflusszytometrischen Analyse als auch unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich in den eigenen Experimenten aber eine deutliche Aggregatbildung, die auch durch eine Ultraschallbehandlung der microspheres-Suspension nicht deutlich reduziert werden konnte. Somit wurden die Fluospheres polystyrene microspheres als ungeeignet für die durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung beurteilt und nach weiteren Alternativen gesucht.

5.14.2 CALTAG Counting Beads

Daher wurden nun verschiedene speziell für Absolutzellzahlbestimmungen in der Durchflusszytometrie entwickelte bead-Fabrikate getestet.

Zunächst kamen die CALTAG Counting Beads zum Einsatz. Trotz bestimmungsgemäßem Gebrauch kam es jedoch auch bei diesem Produkt zu einer starken Aggregatbildung. Diese ist in Abb. 33 a in der FSC-H/SSC-H-Darstellung erkennbar an der zusätzlichen Population B über den Beads (A). Die Aggregate machen mit 5,81% aller Ereignisse über 22% der Summe aus A und B aus. Die CALTAG Counting Beads enthalten zur internen Kontrolle zwei verschiedene Bead-Populationen die etwa im Verhältnis 1:1 vorliegen sollten. Trotz strikter Einhaltung der Herstellerangaben war allerdings nicht zu vermeiden, dass das Verhältnis der beiden unterschiedlichen Bead-Populationen A (18,4%) und B (81,59%) weit außerhalb der für valide Messungen akzeptablen Toleranz lag (Abb. 33 b). Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurden auch diese CALTAG Counting Beads als nicht geeignet beurteilt.

Ergebnisse

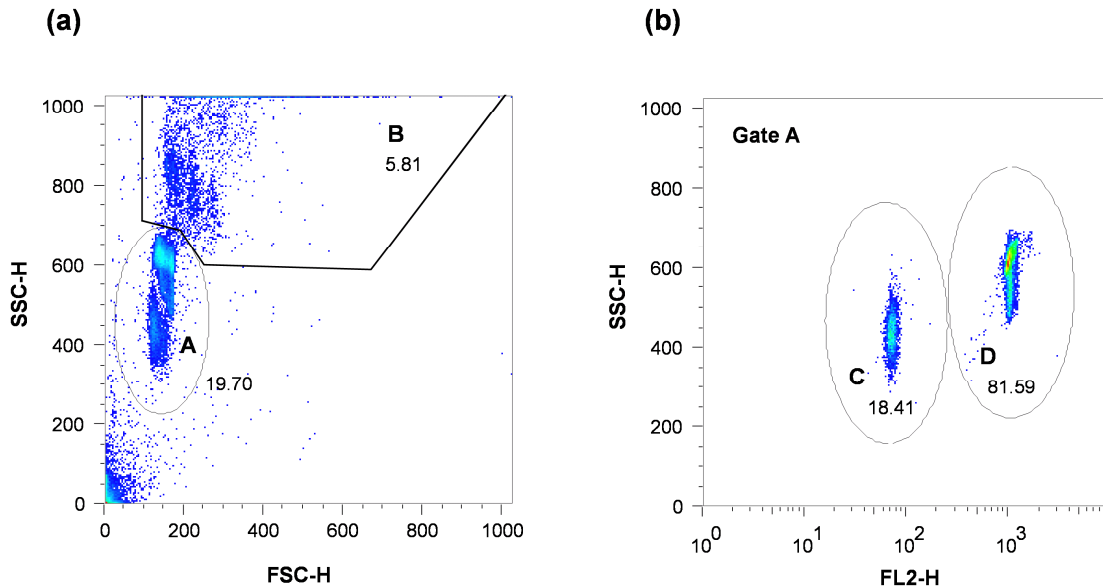


Abb. 33:

Messung der Caltag Counting Beads

A: Beads (singlets); B: Beads (doublets); C, D: zwei verschiedene Populationen zur internen Kontrolle

5.14.3 Flow-Count Fluospheres

Das nächste getestete Fabrikat waren die Flow-Count Fluospheres von Beckman Coulter. Diese beads sind explizit für die *in vitro* Diagnostik zugelassen.

Für valide Messungen müssen die Beads-Dubletten quantifiziert werden. Laut Angaben des Herstellers können die Dubletten über ihre höheren FSC-H-Werte identifiziert werden. In den eigenen Experimenten gelang dies aber nicht, da sich die Dubletten in diesem Parameter nicht von den durch sehr heterogene FSC.H-Werte gekennzeichneten Singlets unterscheiden (Abb. 34 c) Statt dessen gelang aber die Sichtbarmachung und Quantifizierung der Aggregate durch ihre im Vergleich zu den Singlets stärkere Fluoreszenz. Aufgrund der außerordentlich starken Fluoreszenz der Flow-Count Fluospheres im Vergleich zu gefärbten Zellen war dafür aber eine starke Reduzierung der Verstärkung eines der drei Fluoreszenzkanäle notwendig. Bei der der Abb. 34 zugrunde liegenden Messung, war FL3-H reduziert worden. Auch in der Zeit/FL3-H-Darstellung lassen sich die Dubletten gut identifizieren (b). Im FL3-H-Histogramm (a) zeigt sich, dass mit ca 6% nur wenige Dubletten (B) nachweisbar waren. Da die Quantifizierung der Dubletten nach den Herstellerangaben aber für jede Messung zu erfolgen hat, ergab sich ein Problem. Durch die erforderliche Reduzierung der Verstärkung eines Fluoreszenzkanals konnte dieser nicht mehr für die Leukozytendifferenzierung genutzt werden. Somit war zwar gezeigt, dass mit Hilfe der Flow-Count Fluospheres eine Quantifizierung bei Doppelfärbungen gelingen

Ergebnisse

konnte. Für Färbungen die aller drei Fluoreszenzkanäle bedürfen, können sie aber nicht eingesetzt werden. Damit kamen auch die Flow-Count Fluospheres nicht für die absolute Zellquantifizierung bei der oben beschriebenen Leukozytenfärbung in Frage.

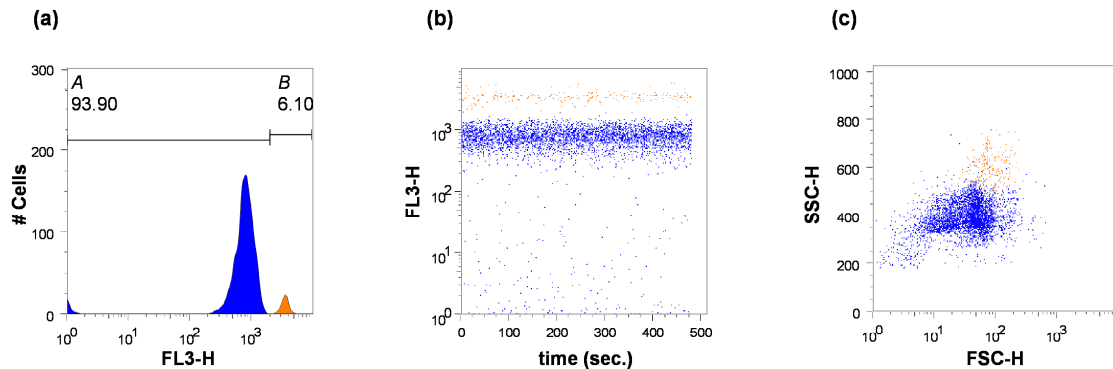


Abb. 34:
Messung der Flow-Count Fluospheres Beads
Darstellung von singlets A (blau) und doublets B (ocker)

5.14.4 TruCOUNT beads

Mit den ebenfalls für durchflusszytometrische *in vitro* Diagnostik zugelassenen TruCOUNT beads von Becton Dickinson wurde ein weiteres Fabrikat überprüft.

Die Darstellung der Beads gelang bei Verwendung derselben Geräteeinstellungen, die auch für die neu etablierte Leukozytendifferenzierung zum Einsatz kamen. Durch Übertragung der im Gate A befindlichen Beads in ein FL3-H-Histogramm konnte zwischen Singlets (B) und Dubletten (C) unterschieden werden.

Abb. X zeigt die Ergebnisse der Messung einer Blutprobe die nach dem unter Y beschriebenen Verfahren in einem TruCOUNT Tube gefärbt wurde. Dadurch dass keinen störenden Interferenzen zwischen Zellen, Beads und Färbung auftraten, und zudem bei den üblichen Geräteeinstellungen eine Überprüfung des Dublettenanteils der Beads jederzeit möglich war, erwiesen sich die TruCOUNT beads von Becton Dickinson als geeignet für die Verwendung in der bereits etablierten Leukozytenfärbung (Abb. 35).

Ergebnisse

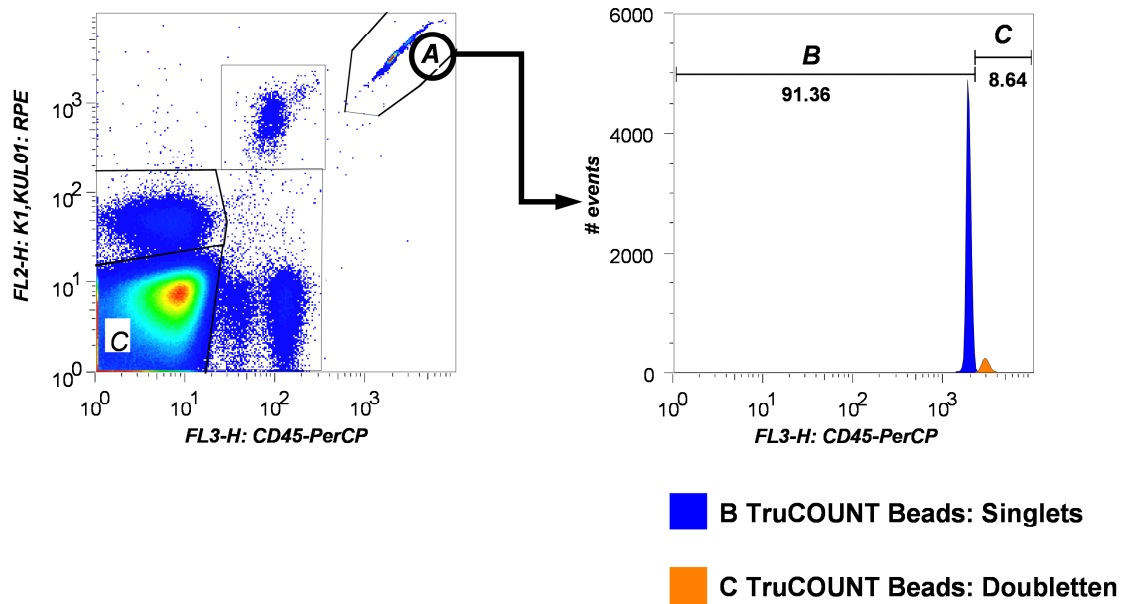


Abb. 35:

Messung der TruCOUNTbeads in Kombination mit einer nach dem neu entwickelten Verfahren (α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC) gefärbten Hühnerblutprobe

5.15 Messdauer

Da die Messgenauigkeit des eingesetzten Zytometers bei einer Flussrate über ca. 3000 events/sec abnimmt, war das Protokoll zur Färbung und Aufbereitung der Proben so optimiert worden, dass dieser Wert nicht überschritten wird. Bei einer beabsichtigten Zählung von etwa 5.000 bis 10.000 Leukozyten erforderte dies aber eine Messdauer von etwa 3 – 4 min. Um zu überprüfen, ob sich lange Messzeiten eventuell negativ auswirken, wurden 10 min lange Messungen durchgeführt. Abb. 36 a-d demonstriert die angewandte Gatingstrategie mit den zugehörigen Populationen wie bereits unter 5.13.4.7. dargestellt. Abb. 36 e-f bildet die pro Zeiteinheit registrierten Ereignisse der einzelnen Populationen als Histogramme ab. In Abb. 36 f sind die Kurven der Histogramme den Rohdaten entsprechend „zackig“ abgebildet. Die übrigen Darstellungen sind zur besseren Beurteilbarkeit von Tendenzen durch die Funktion „smooth Histogramm“ bei der Bearbeitung mit FlowJo geglättet worden. Neben den zufallsmäßig wirkenden Schwankungen während der Messung ist für alle Kurven lediglich ein minimaler Abwärtstrend der registrierten Ereignisse pro Zeiteinheit zu verzeichnen. Diese können beispielsweise mit einer geringgradigen Ausdünnung des Partikelgehaltes in den oberen Anteilen der Flüssigkeitssäule im Messröhrchen durch Sedimentation der Zellen und beads erklärt werden. Da die

Ergebnisse

Abnahme der Ereignisse sehr gering ist und alle Populationen einschließlich der Beads gleich stark betrifft, kann geschlussfolgert werden, dass das entwickelte Verfahren für Messungen einer Dauer von wenigen Minuten sehr gut geeignet ist.

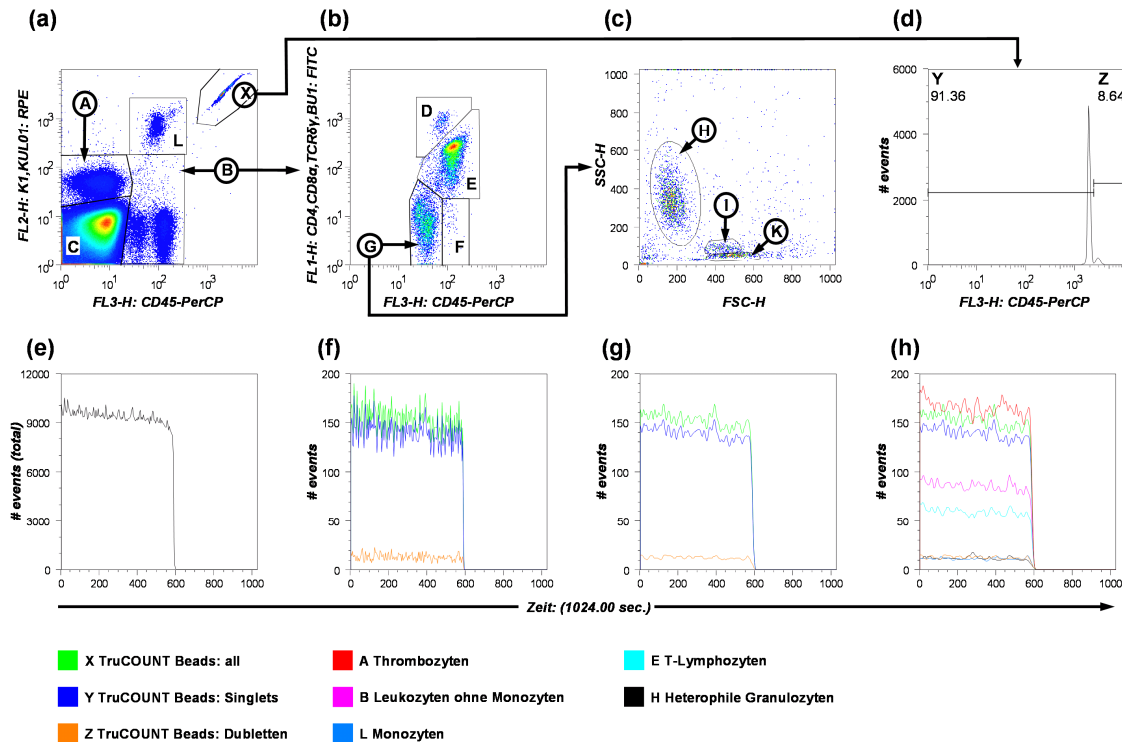


Abb. 36:
Langzeit-Messung (10 min) der TruCOUNTbeads in Kombination mit einer nach dem neu entwickelten Verfahren (α CD45-PerCP, K1-RPE, KUL01-RPE, α CD4-FITC, α CD8 α -FITC, BU1-FITC, α TCR $\gamma\delta$ -FITC) gefärbten Hühnerblutprobe

5.16 Einfluss der Fixierung auf die „Gating“-Strategie

Bei einer breiteren Anwendung der Leukozytenzählung würde vermutlich ein Versand der Proben ins Untersuchungslabor notwendig sein welcher eine Fixierung der Proben erfordert. Daher wurde überprüft, ob die Leukozytenzählung und – differenzierung mit dem entwickelten Verfahren bei Verwendung von fixiertem Hühnerblut auch noch einige Tage nach der Blutentnahme möglich ist. Hierzu wurden Blutproben von 10 Hühnern gewonnen und mit dem kommerziell erhältlichen Fixierungsmittel Transfix fixiert. Um feststellen zu können wie sich die Fixierung auf die Analyse auswirkt, wurde ein Dreifachansatz gewählt. Ein Aliquot jeder Blutprobe wurde vor der Fixierung abgezweigt und innerhalb weniger Stunden nach der Blutentnahme wie gewohnt gefärbt und analysiert. Ein weiteres Aliquot wurde fixiert. Aus den fixierten Proben wurde nach wenigen Stunden wieder ein Aliquot entnommen, gefärbt und gemessen. Im dritten Durchgang wurden Aliquots

Ergebnisse

etwa 72 Stunden nach der Fixierung untersucht. Bei der Auswertung der Messungen fiel auf, dass sich das Erscheinungsbild einiger Populationen durch die Fixierung in nicht unerheblichem Maße verändert. Die oben beschriebene Gatingstrategie zur Identifizierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen mußte deshalb bei der Auswertung der Proben modifiziert werden. Ziel war es, dabei eine „universelle“ Gatingstrategie zu entwickeln, deren Gates nicht mehr adaptiert werden müssen, unabhängig davon, ob die gemessenen Proben unfixiert, frisch fixiert oder bereits seit einigen Tagen fixiert sind.

5.16.1 „Gating“-Strategie für unfixierte Proben (Tag 0)

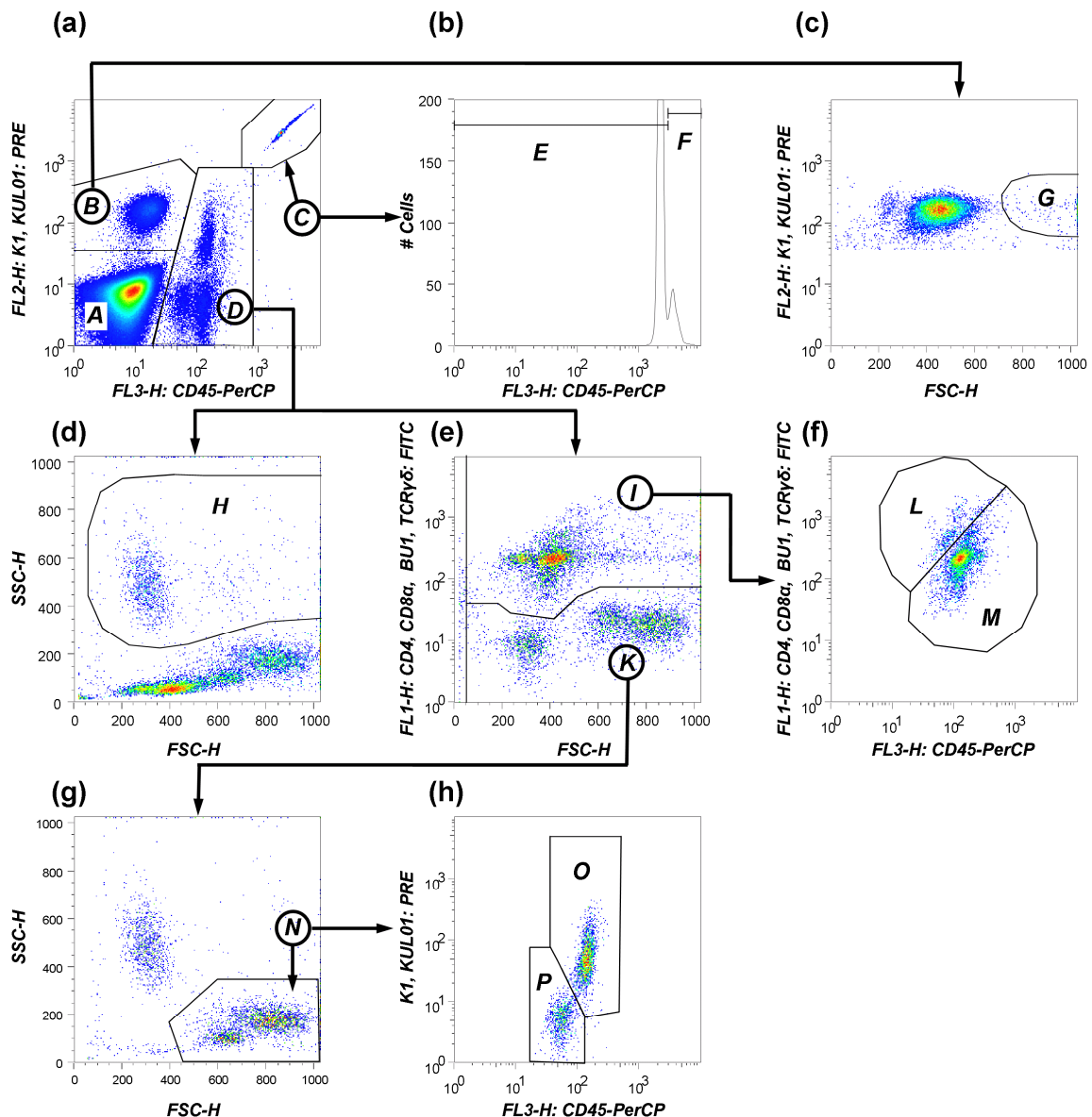


Abb. 37:
 „gating-Strategie“ zur Leukozytendifferenzierung und Zählung für nicht fixierte Hühnerblutproben
 A: Erythrozyten; B: Thrombozyten; D: Leukozyten;
 C: TruCOUNT Beads; E: TruCOUNT Beads (Singlets); F: TruCOUNT (Beads Dubletten);
 G: Thrombozyten (Aggregate); H: heterophile Granulozyten;
 I: Lymphozyten; K: Monozyten, heterophile und basophile Granulozyten;
 L: B-Lymphozyten; M: T-Lymphozyten; O: Monozyten; P: basophile Granulozyten;

Abb. 37 zeigt die „gating-Strategie“ für Blutproben, die vor der Färbung nicht fixiert wurden. Sie wurde so optimiert, dass auch frisch fixierte Proben mit ihr analysiert werden können. In der FL3-H/FL2-H-Darstellung (a) werden Erythrozyten (A), Thrombozyten (B), Beads (C) und Leukozyten (D) als Populationen erfasst. Die beads (C) werden im FL3-H-Histogramm (b) auf den Gehalt an Aggregaten (F) untersucht. Die Thrombozyten (B) können in ein FSC-H/FL2-H dotplot (c) übertragen

werden, um die Probe auf einen erhöhten Gehalt an Thrombozytenaggregaten (G) zu prüfen. Die Leukozyten (D) werden in zwei verschiedene Darstellungen übertragen. Im FSC-H/SSC-H-dotplot (d) werden die heterophilen Granulozyten (H) erfasst. Im FSC-H/FL1-H-dotplot (e) werden die Populationen I und K von einander getrennt. Die Darstellung von I im FL3-H/FL1-H-plot (f) erlaubt die Differenzierung von B-Lymphozyten (L) und T-Lymphozyten (M). Aus der Population (K) werden im FSC-H/SSC-H-plot (g) die Granulozyten entfernt. Die verbleibenden Zellen (N) lassen sich im FL3-H/FL2-H-plot (h) in Monozyten (O) und restliche Leukozyten (v.a. basophile Granulozyten) (P) aufteilen.

5.16.2 „Gating“-Strategie für frisch fixierte Fixierte Proben (Tag 0)

Frisch fixierte, innerhalb weniger Stunden gemessene Proben können ebenfalls nach dem eben geschilderten Schema ausgewertet werden.

5.16.3 „Gating“-Strategie für fixierte Fixierte Proben (Tag 3)

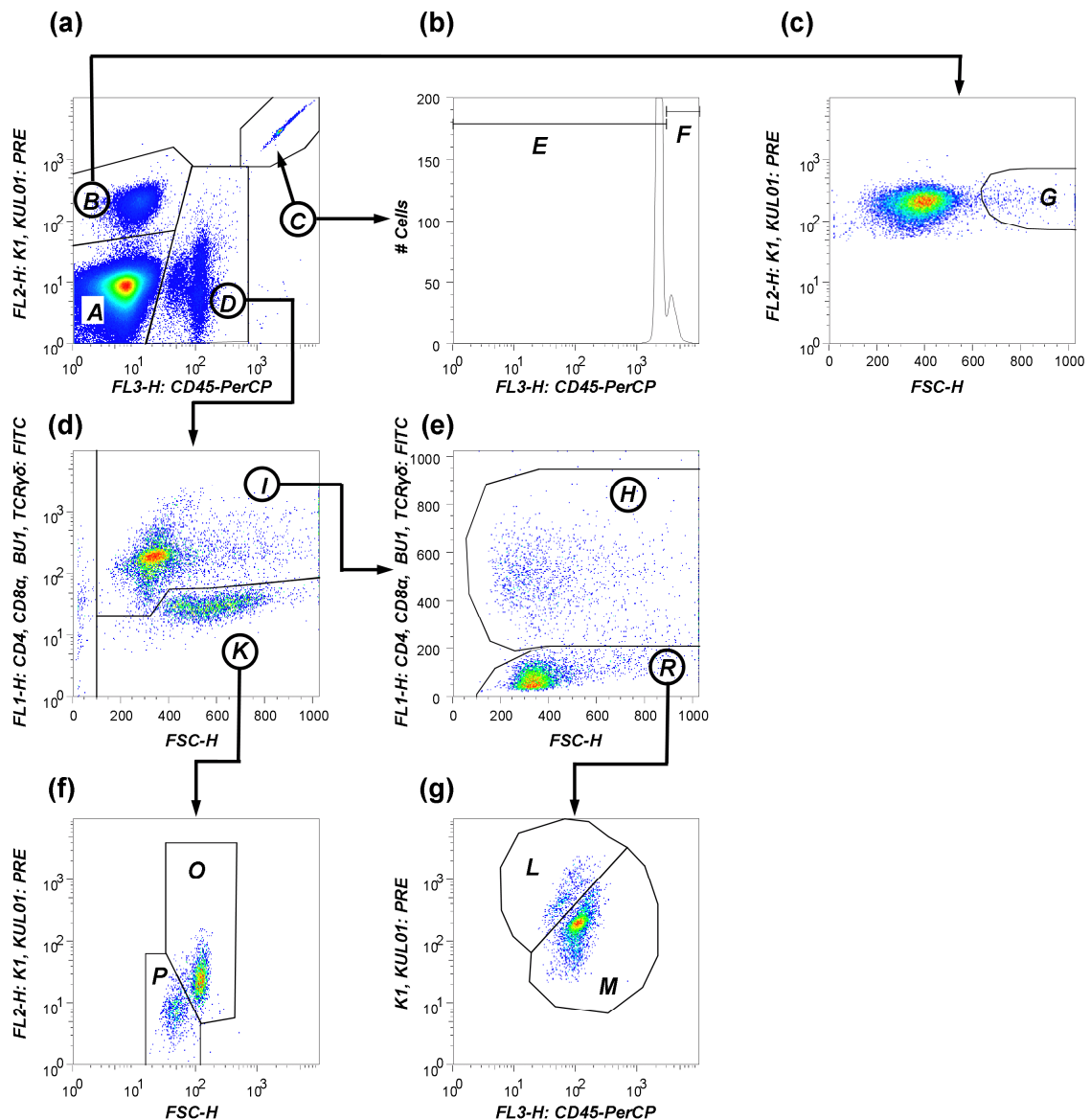


Abb. 38:
 „gating-Strategie“ zur Leukozytendifferenzierung und Zählung für seit einigen Tagen fixierte Hühnerblutproben
 A: Erythrozyten; B: Thrombozyten; D: Leukozyten;
 C: TruCOUNT Beads; E: TruCOUNT Beads (Singlets); F: TruCOUNT (Beads Dubletten);
 G: Thrombozyten (Aggregate); H: heterophile Granulozyten;
 I: heterophile Granulozyten und Lymphozyten; K: Monozyten und basophile Granulozyten;
 L: B-Lymphozyten; M: T-Lymphozyten; O: Monozyten; P: basophile Granulozyten;
 R: Lymphozyten

Für die Proben die am dritten Tag nach der Fixierung gemessen wurden, musste die „gating-Strategie“ leicht adaptiert werden (Abb. 38). Der Grund dafür ist, dass die heterophilen Granulozyten zu diesem Zeitpunkt durch die Fixierung offensichtlich eine deutliche FL1-H-Fluoreszenz entwickelt hatten. Dies äußert sich darin, dass sie im FSC-H/FL1-H-Plot (d) nun im gate I liegen und nicht mehr im gate K wie bei der

Auswertung der unfixierten oder frisch fixierten Proben (Abb. 37 e,g) Sie werden deshalb aus der Population I im FSC-H/SSC-H plot als Population H identifiziert (Abb. 37 d,e). Aus der verbleibenden Population R können im FL3-H/FL1-H-plot (g) B-Lymphozyten (L) und T-Lymphozyten (M) erfasst werden. Die Population K lässt sich im FSC-H/FL2-H-plot (f) in Restleukozyten (P) und Monozyten (O) auftrennen. Es gibt auch andere Möglichkeiten die verschiedenen Leukozytenpopulationen zu identifizieren. Die hier beschriebenen „Gatingstrategien“ wurden anhand der Beurteilung von Vielfarb-Overlays wie unter 5.13.4.7 und in Abb. 31 gezeigt unter Beachtung aller durch Permutation der Messparameter möglichen zweidimensionalen dotplot-Darstellungen entwickelt. Sie wurden deshalb ausgewählt, weil sie eine bestmögliche Unterscheidung nahe beieinander liegender Populationen ermöglichen. Zudem erleichtern sie durch die identische Struktur und den systematischen Aufbau die automatisierte Auswertung der Rohdaten mit dem Computerprogramm FlowJo.

5.17 Überprüfung der Präzision des Verfahrens

Zu Validierungszwecken sollte die Präzision des neuen Verfahrens ermittelt und mit der Mikroskopie verglichen werden.

5.17.1 Präzision der mikroskopischen Leukozytenschätzung

Zunächst wurde die Präzision der Mikroskopie ermittelt.

Dazu wurden von einer Hühnerblutprobe zahlreiche Ausstriche hoher Qualität angefertigt. 10 Ausstriche wurden mikroskopisch von einem sehr routinierten Untersucher ausgezählt. Die Mikroskopische Leukozytenschätzung erfolgte nach dem von Pendl modifizierten Schätzverfahren nach Campbell (s. 4.5.4.2.1) (Ito and Bohm 1986). Die durch die Schätzung ermittelten Absolutzahlen sind in Tab. 5 aufgeführt. Für jeden einzelnen Zelltyp wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus den 10 Schätzungen errechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 und Abb. 40 graphisch dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Vorkommenshäufigkeit der verschiedenen Zelltypen wurden zwei Abbildungen mit unterschiedlicher Skalierung der X-Achse erstellt. Die Variationskoeffizienten können Tab. Tab. 5 entnommen werden.

Ergebnisse

Ausstrich	Thrombozyten	Leukozyten	Lymphozyten	Monozyten	Heterophile	Basophile	Eosinophile	Blasten
1	51333	35583	26047	4377	3487	996	676	0
2	67083	37333	25200	6048	2725	2464	709	261
3	64167	42583	28190	8048	3705	1916	724	0
4	70000	38500	23370	8047	4620	1309	886	270
5	70000	47250	29626	9970	3922	2552	756	425
6	74083	29167	19658	4579	2654	1254	875	117
7	65917	39083	24075	9067	2345	2462	860	274
8	54833	27417	17245	6196	2440	1042	494	55
9	54250	30917	18117	6709	3401	1268	1329	93
10	53667	37333	22027	8699	3845	1568	1120	75
MW	62533	36517	23356	7174	3314	1683	843	157
STAW	7821	5770	3925	1796	709	585	225	135
VC	12.5%	15.8%	16.8%	25.0%	21.4%	34.7%	26.7%	85.9%

Tab. 5:
Präzision der mikroskopischen Leukozytenschätzung

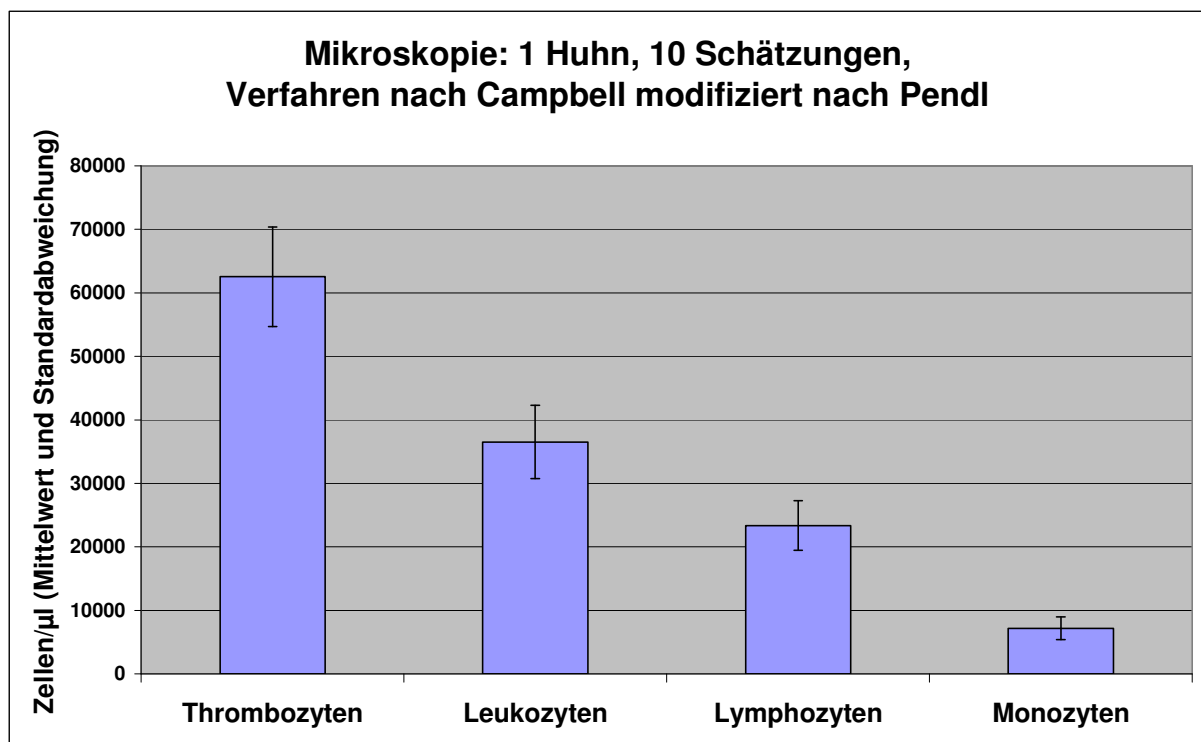


Abb. 39:

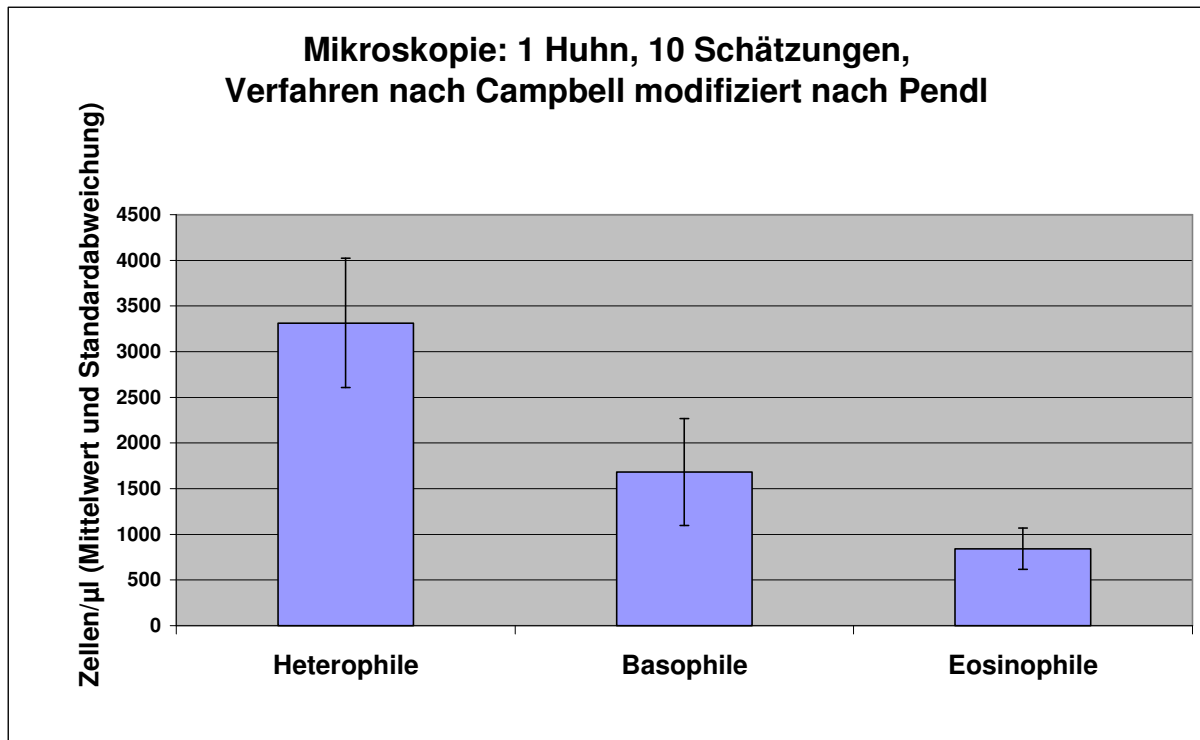


Abb. 40:

5.17.2 Präzision der durchflusszytometrischen Leukozytenzählung

Nach dem gleichen Schema wurde die Präzision des durchflusszytometrischen Verfahrens bestimmt. Aus einer Blutprobe wurden 10 Aliquots entnommen, verdünnt, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei kam die oben beschriebene gatingstrategie (s. 5.13.4.7) sowie die Technik der absoluten Quantifizierung mittels TruCOUNT Tubes (s. 5.14.4) zum Einsatz. Die durchflusszytometrisch ermittelten Absolutzahlen sind in Tab. 6 aufgeführt. Für jeden einzelnen Zelltyp wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus den 10 Messungen errechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 41 und Abb. 42 graphisch dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Vorkommenshäufigkeit der verschiedenen Zelltypen wurden auch hier wiederum zwei Abbildungen mit unterschiedlicher Skalierung der X-Achse erstellt. Die Variationskoeffizienten können entnommen werden (Tab. 6).

Ergebnisse

Messung	Thrombozyten	Leukozyten	Lymphozyten	T-Lymphozyten	Heterophile	Monozyten	B-Lymphozyten	Basophile
1	34741	18916	16291	15724	1482	1017	552	140
2	35271	18938	16003	15519	1637	1181	470	131
3	38684	20618	17611	17132	1617	1215	470	184
4	37164	19746	16667	16163	1598	1327	484	174
5	36465	19802	16809	16296	1501	1327	513	165
6	36120	20138	17198	16728	1560	1259	460	131
7	35423	19867	16830	16370	1477	1458	455	107
8	37227	20453	17103	16628	1816	1395	455	160
9	37599	20465	17129	16644	1642	1550	470	160
10	36278	19819	16551	16037	1569	1598	499	116
MW	36497	19876	16819	16324	1590	1333	483	147
STAW	1136	559	446	461	95	167	29	24
VC	3.1%	2.8%	2.7%	2.8%	6.0%	12.5%	6.1%	16.6%

Tab. 6:
Präzision der durchflusszytometrischen Leukozytenzählung

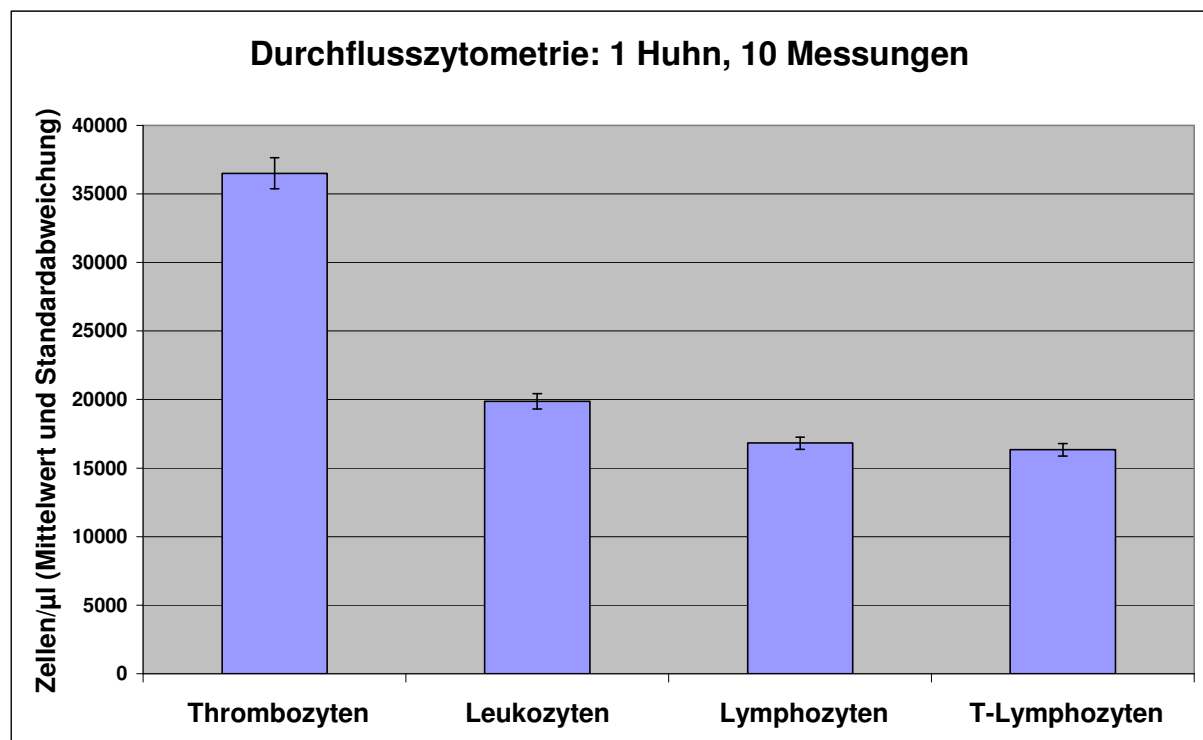


Abb. 41:

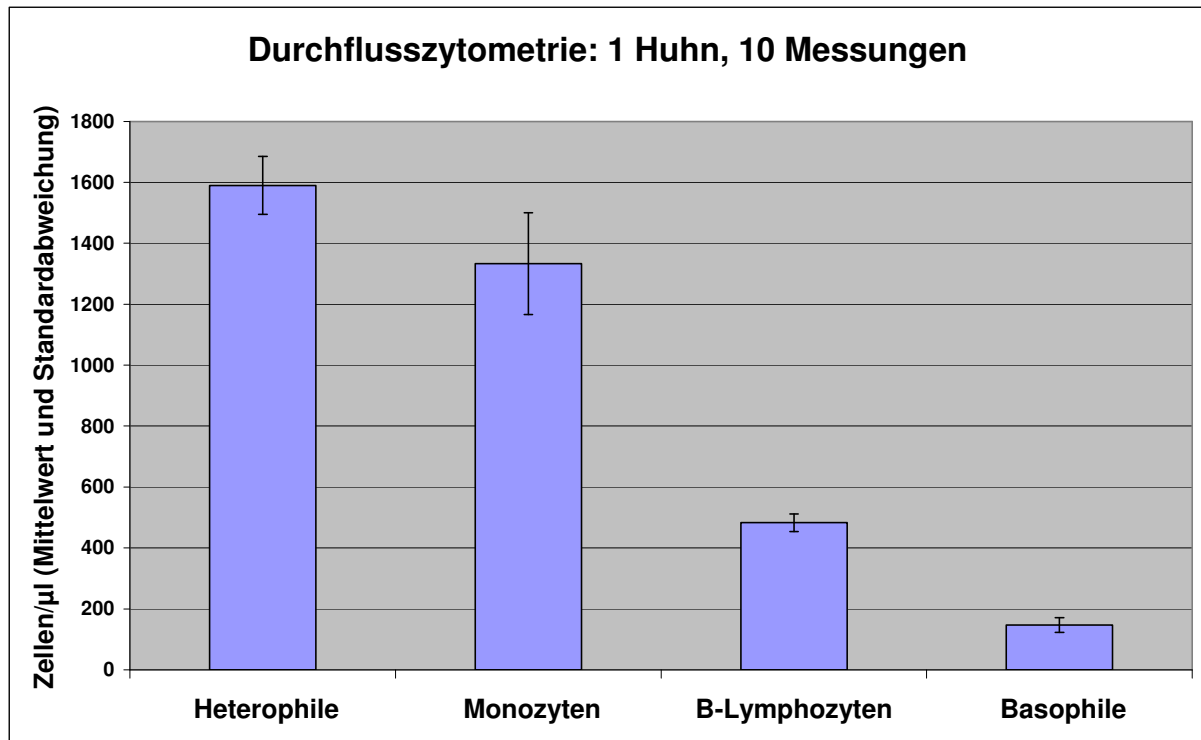


Abb. 42:

5.17.3 Vergleich der Präzision von Durchflusszytometrie und Mikroskopie

Um die Präzision von Durchflusszytometrie und Mikroskopie direkt vergleichen zu können, wurden die für den jeweiligen Zelltyp mit den beiden Verfahren ermittelten Variationskoeffizienten einander in einem gruppierten Säulendiagramm gegenübergestellt (Abb. 43). Lediglich der extrem hohen Variationskoeffizient der mikroskopischen Blastenschätzung wurde ausgeschlossen. Da die Eosinophilen nicht durchflusszytometrisch bestimmt werden konnten ist für diesen Zelltyp nur ein Wert dargestellt. Umgekehrt gilt das für die durchflusszytometrische Bestimmung der B- und T-Lymphozyten.

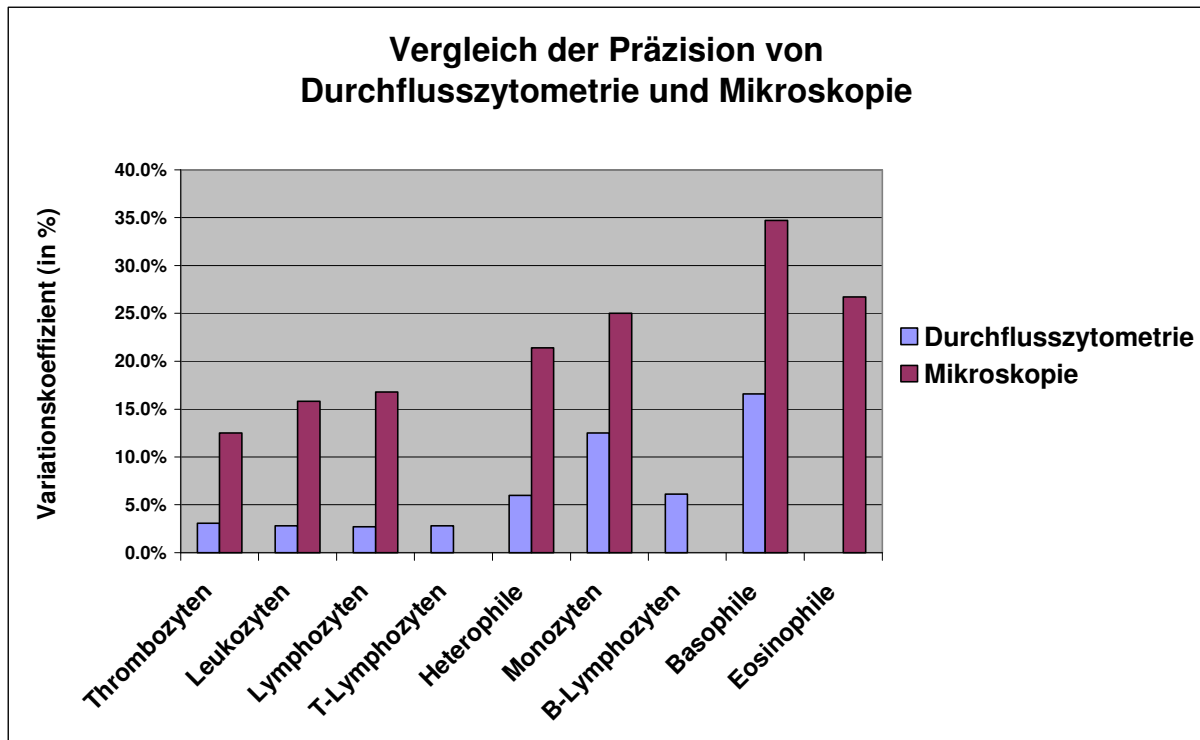


Abb. 43:

5.18 Übereinstimmungsgrad zwischen Mikroskopie und Durchflusszytometrie / innerhalb der Durchflusszytometrischen Verfahren (unfixiert/ fixiert Tag 0/ fixiert Tag 3)

In Ermangelung eines „Goldstandards“ zur Leukozytenzählung und –differenzierung beim Huhn an dem das neu entwickelte Verfahren gemessen werden könnte, wurde der Übereinstimmungsgrad zwischen durchflusszytometrisch und mikroskopisch ermittelten Leukozytenzahlen untersucht. Dazu wurden Blutproben von 10 Hühnern sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch analysiert. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte wie gewohnt (4.5.4).

Um gleichzeitig den Einfluss der Blutprobenfixierung und der Auswertung mit Hilfe unterschiedlicher Gatingstrategien auf die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen abschätzen zu können, wurde jede Blutprobe aliquotiert und nach drei verschiedenen Protokollen behandelt und analysiert (s. 5.16). So wurde von jedem der 10 Hühner für die unterschiedlichen Zelltypen bis zu vier Absolutwerte ermittelt. Der erste stammte aus der Mikroskopischen Schätzung, die drei weiteren aus den Durchflusszytometrischen Analysen. Durchflusszytometrisch wurden zuerst wiederum die unfixierten Aliquots noch am Tage der Blutentnahme untersucht. Am gleichen Tag fand auch die Messung der erst vor wenigen Stunden fixierten Proben

Ergebnisse

statt. Das letzte Aliquot jeder Probe wurde am Tag der Blutentnahme nach dem unter 4.6.7.2 beschriebenen Verfahren fixiert und drei Tage später (ca 72 h) gefärbt (s. 5.13.4.7) und gemessen. Die Auswertung für die am ersten Tag gemessenen Aliquots erfolgte mit der Gatingstrategie für unfixierte Proben 5.16.1. Die am dritten Tag untersuchten Proben wurden nach dem Protokoll für fixierte Proben analysiert (s. 5.16.3).

Die Ergebnisse hier werden hier graphisch veranschaulicht. In jedem Säulendiagramm werden für einen Zelltyp und jedes der 10 Hühner jeweils 4 absolute Werte angegeben. Da die B- und T-Lymphozyten mikroskopisch nicht differenziert werden konnten, fehlen die entsprechenden Werte in den Diagrammen. Weil es sich bei den drei durchflusszytometrischen Messungen je Tier nicht um Wiederholungsmessungen mit der exakt gleichen Technik handelt, sind hier keine Mittelwerte der Zytometrischen Messungen abgebildet. Stattdessen demonstriert die Darstellung der Ergebnisse in einer Serie von gruppierten Säulendiagrammen, dass von jedem Huhn drei unterschiedlich verarbeitete Aliquots durchflusszytometrisch analysiert wurden. Auf diese Weise kann ein Vergleich innerhalb der Durchflusszytometrischen Verfahren aber auch zwischen Zytometrie und Mikroskopie in einer Darstellung erfolgen.

Ergebnisse

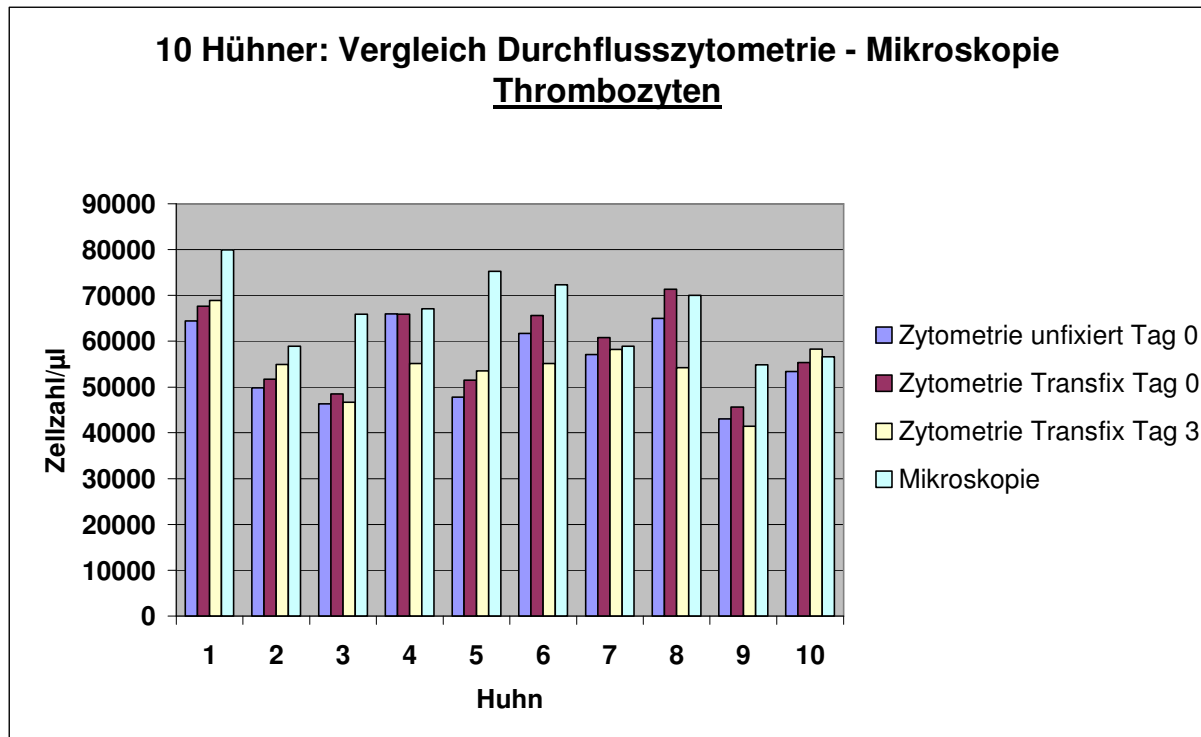


Abb. 44:

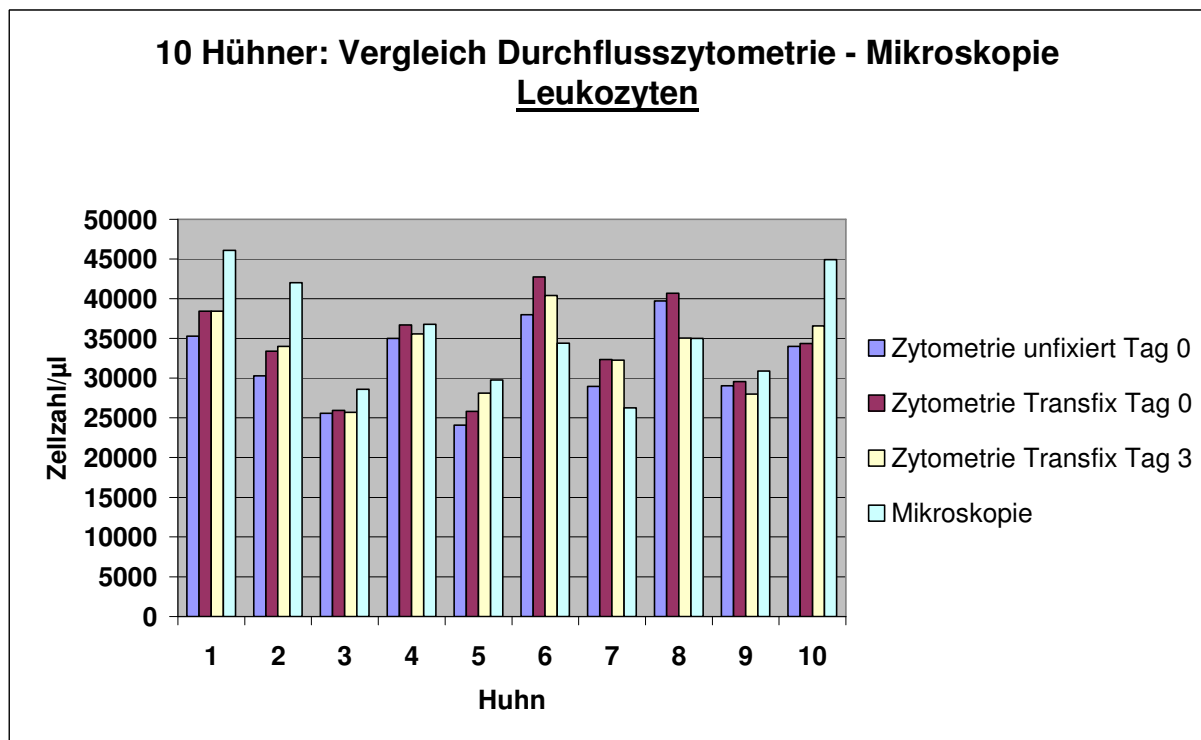


Abb. 45:

Ergebnisse

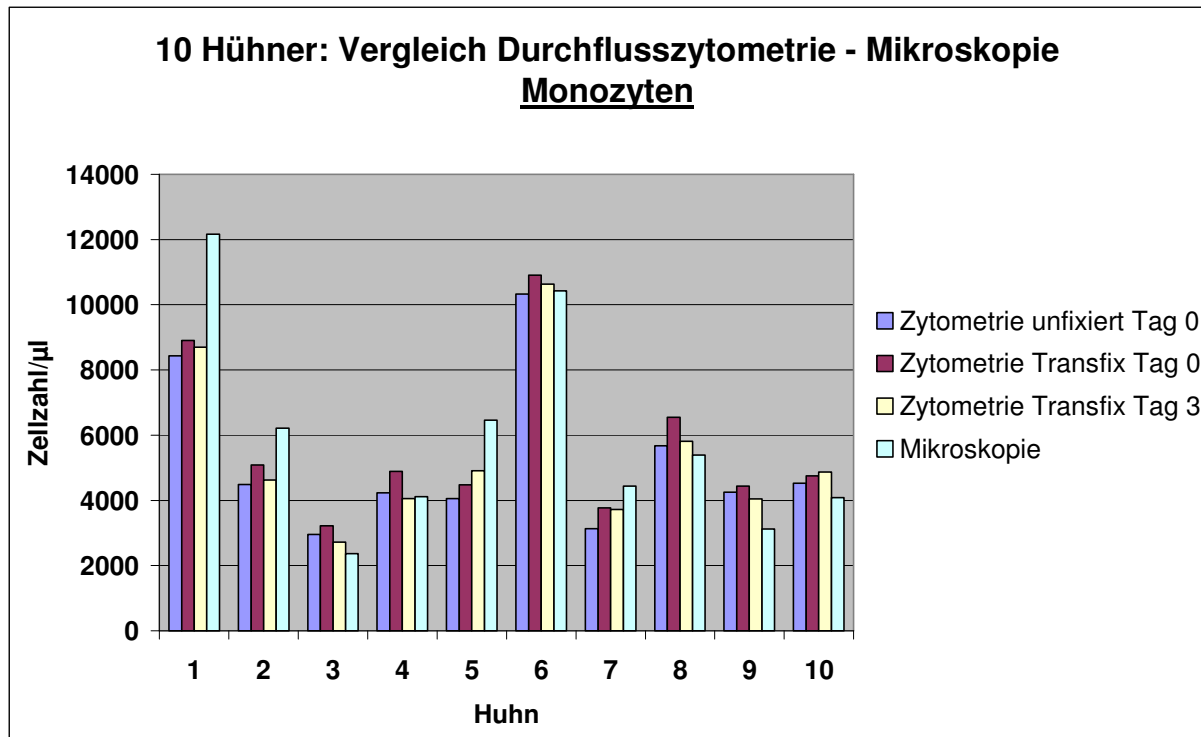


Abb. 46:

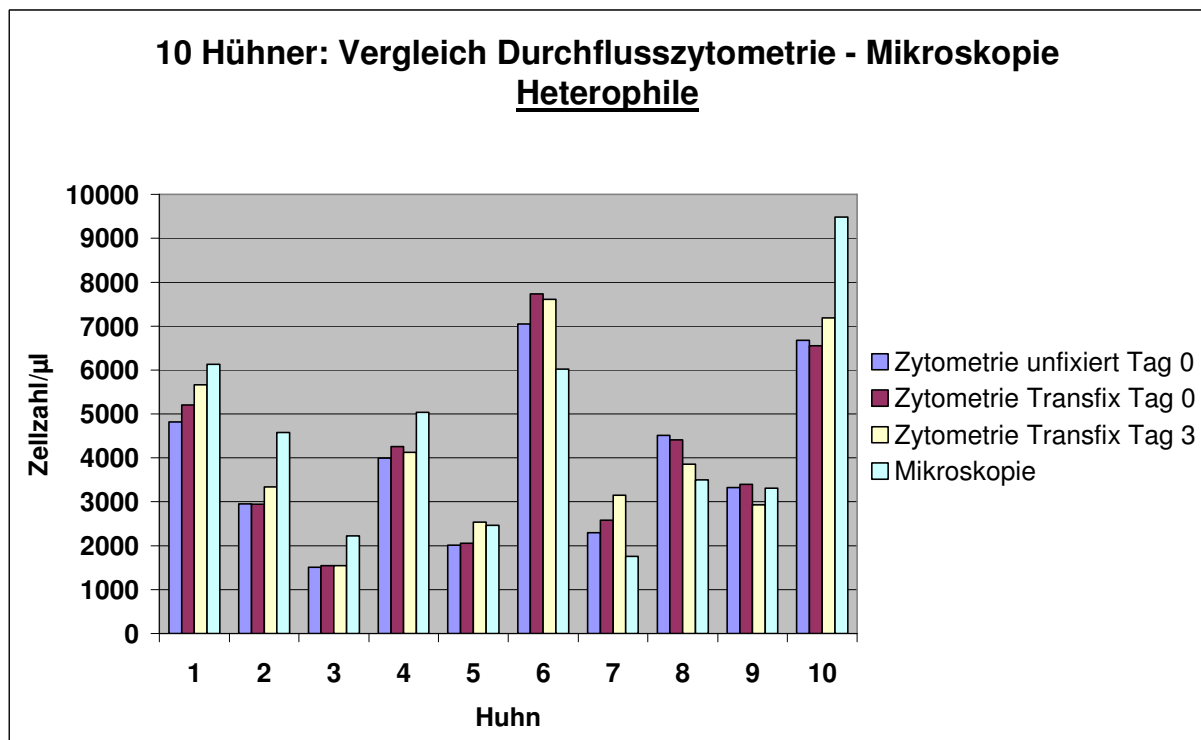


Abb. 47:

Ergebnisse

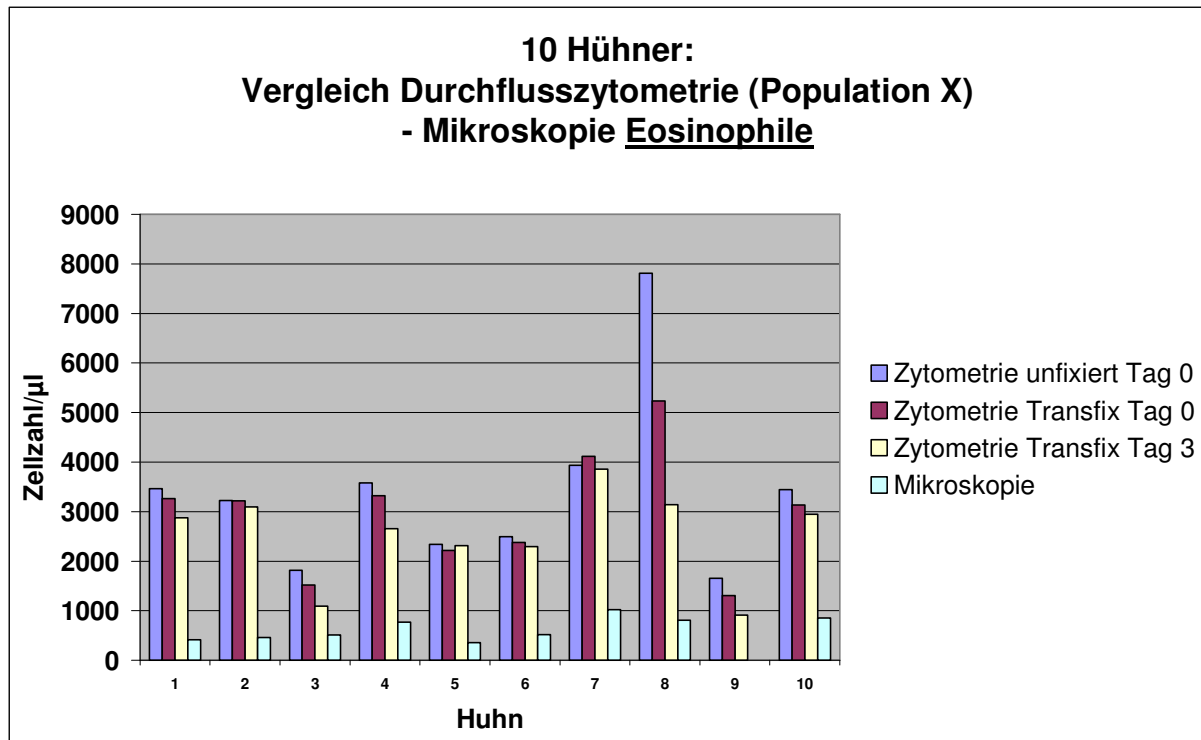


Abb. 48

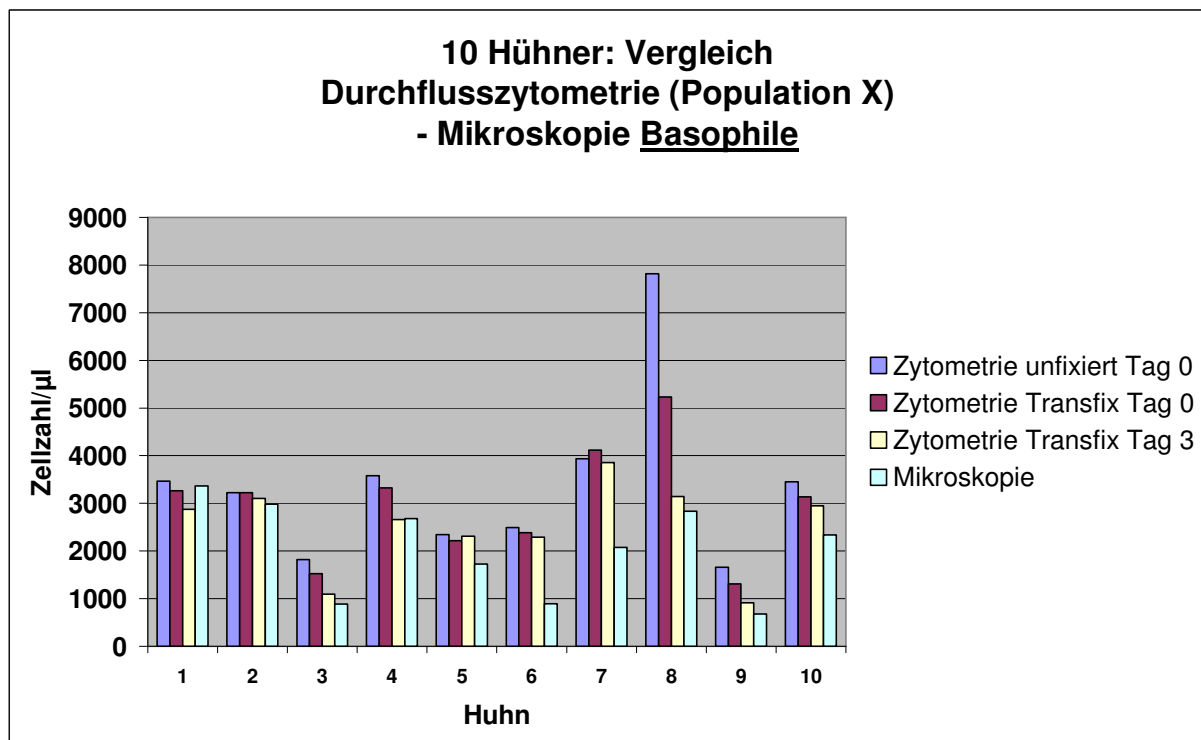


Abb. 49:

Ergebnisse

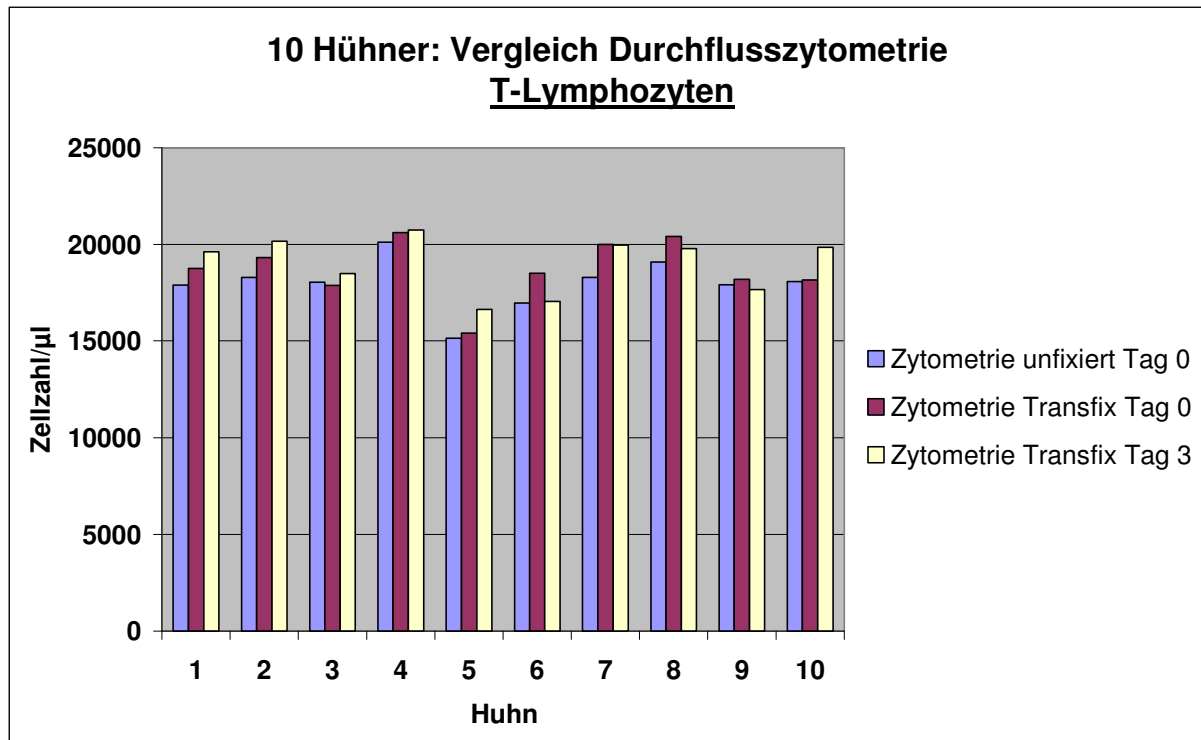


Abb. 50:

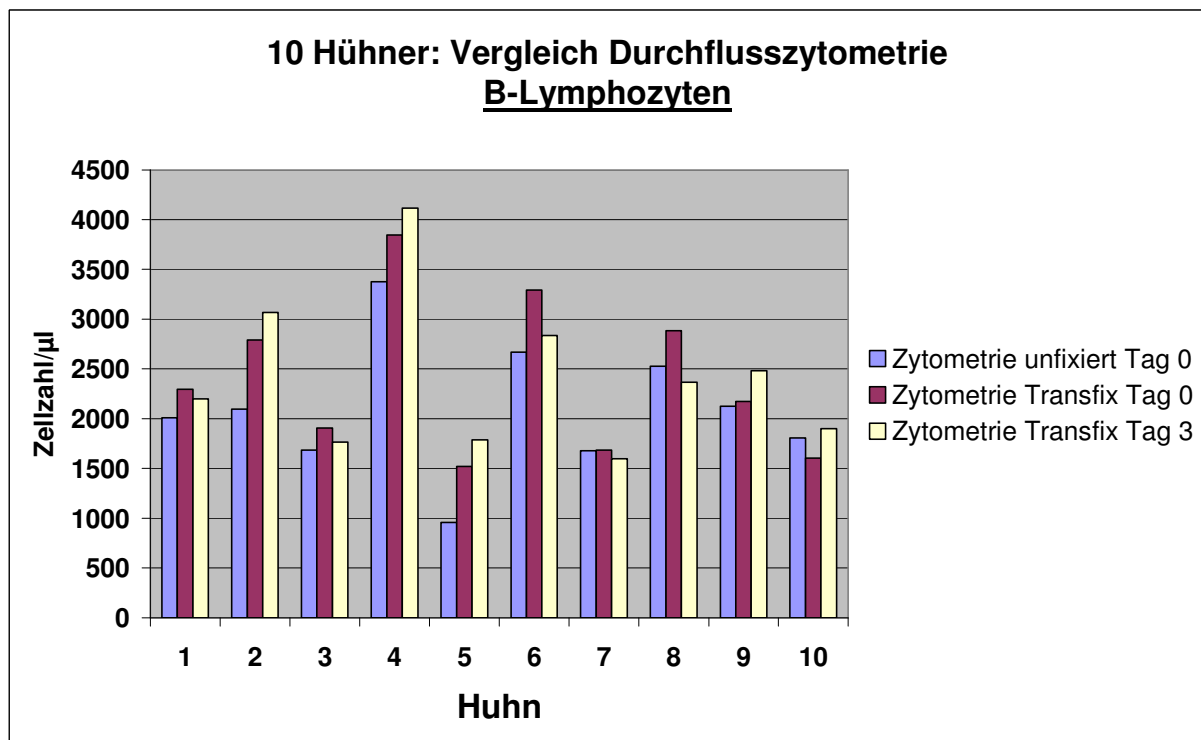


Abb. 51:

Ergänzend sind die untenstehenden Ergebnisse im Anhang der Arbeit in Form von difference-plots abgebildet. Auch die deskriptive Statistik sowie die Prüfung auf Signifikante Unterschiede mittels Wilcoxon-Test ist im Anhang dargestellt. Die Bewertung und Diskussion der Daten findet sich unter 6.3.

6 Diskussion

In der Human- und Säugetiermedizin gehören die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl sowie die Erstellung des Differentialblutbilds zu den wichtigsten und am häufigsten durchgeführten labordiagnostischen Tests. Im Gegensatz dazu verhindern die hämatologischen Besonderheiten der Vögel, insbesondere die kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten, eine erfolgreiche Untersuchung von Vogelblut mit den in der Human- und Säugetiermedizin verbreiteten Hämatologie-Analysegeräten. In Ermangelung eines geeigneten automatisierten Verfahrens zur entsprechenden Untersuchung von Vogelblut sahen sich Kliniker und Wissenschaftler hinsichtlich der Vogelhämatologie bisher zum Einsatz arbeitsaufwändiger und unzuverlässiger, mikroskopischer Techniken gezwungen oder sie verzichteten gänzlich auf diese Untersuchungen.

Damit war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, eine automatisierte Analysemethode zu entwickeln, die eine präzise Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl bei Vögeln erlaubt. Gleichzeitig sollte das neue Verfahren auch die Erstellung des Differentialblutbildes ermöglichen.

Es stellte sich die Frage, ob mit Hilfe der Durchflusszytometrie die technischen Schwierigkeiten bei der automatisierten Untersuchung von Vogelblut überwunden werden können. Schließlich hat sich die Durchflusszytometrie in der zellbiologischen Forschung und der humanmedizinischen Labordiagnostik bereits als eine äußerst leistungsfähige Methode zur Charakterisierung von in Suspension vorliegenden Zellen etabliert.

Aus zwei Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das Huhn als Modell für alle anderen Vogelspezies gewählt. Zum einen waren aufgrund der am Huhn durchgeführten immunologischen Forschungsarbeiten in den letzten Jahrzehnten bereits viele für die Durchflusszytometrie nutzbare Marker und Methoden entwickelt worden. Zum anderen hat das Huhn als wichtiger Lieferant von Fleisch und Eiern größte Bedeutung für die Ernährung der Menschheit (Koepke 1977).

Mit dem Abschluss der Arbeit waren die oben genannten Ziele erreicht. Es war gelungen ein durchflusszytometrisches Verfahren zu etablieren, das im Wesentlichen auf dem Einsatz monoklonaler Antikörper beruht. Die verwendeten Antikörper sind spezifisch für verschiedene Oberflächenantigene der unterschiedlichen Blutzellen des Huhns. Durch die Kombination eines Panleukozytenmarkers mit einem

Thrombozytenmarker können Gesamtleukozytenzahl und Thrombozytenzahl bestimmt werden. Die absolute Quantifizierung der Zellen wird durch den Verzicht auf Waschschritte und den Einsatz der für die humanmedizinische *in vitro* Diagnostik zugelassenen TruCOUNT Tubes ermöglicht. Diese Röhrchen enthalten eine definierte Anzahl von standardisierten, fluoreszierenden Partikeln (Beads). Durch die Ermittlung des Verhältnisses zwischen gezählten Beads und detektierten Zellen können die absoluten Zellzahlen im Anschluss an die Messung leicht errechnet werden. Auf diese Weise lassen sich aber nicht nur die Gesamtleukozyten- sowie die Thrombozytenzahl bestimmen.

Darüber hinaus erlaubt das neu entwickelte Verfahren die Differenzierung der verschiedenen Leukozytentypen. Dabei helfen einerseits deren Unterschiede hinsichtlich Zellgröße und Granularität. Zum anderen gelingt die Differenzierung bei dem neuen Verfahren durch die Verwendung weiterer monoklonaler Antikörper. Diese binden jeweils spezifisch an unterschiedliche Leukozytenfraktionen. Durch die Kopplung der monoklonalen Antikörper an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können die verschiedenen Zellen anhand ihres Fluoreszenzverhaltens unter dem Laserlicht im Durchflusszytometer unterschieden werden.

Neben der sicheren Unterscheidung zwischen Lymphozyten, Monozyten und heterophilen Granulozyten kann mit dem neuen Verfahren auch zwischen B- und T-Lymphozyten differenziert werden. Zusätzlich lassen sich zwei weitere Leukozytenfraktionen identifizieren. Bei der einen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die basophilen Granulozyten, bei der anderen möglicherweise um die eosinophilen Granulozyten. Für alle Leukozytenfraktionen können mit Hilfe der TruCOUNT Tubes nicht nur relative Werte sondern auch die absoluten Zellzahlen pro Blutvolumen bestimmt werden.

Das Verfahren ist so konzipiert, dass es in einem durchflusszytometrischen Routinelabor einfach durchgeführt werden kann. Eine Bestimmung der Hämatokritwerte ist im Gegensatz zu den mikroskopischen Schätzverfahren nicht nötig. Die Blutprobe muss lediglich resuspendiert, verdünnt und mit einer Färbelösung vermischt werden. Die Färbelösung enthält bereits alle monoklonalen Antikörper die erforderlich sind, um die oben aufgeführten Leukozytenfraktionen differenzieren zu können. Zur Analyse der aufbereiteten Blutprobe können auch Durchflusszytometer älterer Bauart, die nur über einen Laser verfügen, eingesetzt werden. Da die Dauer einer Messung selbst bei derartigen Durchflusszytometern nur

wenige Minuten in Anspruch nimmt, können auch hohe Probenzahlen in kurzer Zeit untersucht werden. In Verbindung mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode zur Fixierung von Vogelblut mit dem für die humanmedizinische Diagnostik entwickelten Fixativ Transfix, erlaubt die neue Technik auch die Untersuchung konservierter Blutproben.

Die Fixierung ist einfach durchzuführen. Es müssen lediglich 80 µl Fixierungslösung und 400 µl EDTA-Blut in ein Röhrchen pipettiert und vermischt werden. Auf diese Weise fixierte Blutproben können bei Raumtemperatur gelagert oder verschickt werden.

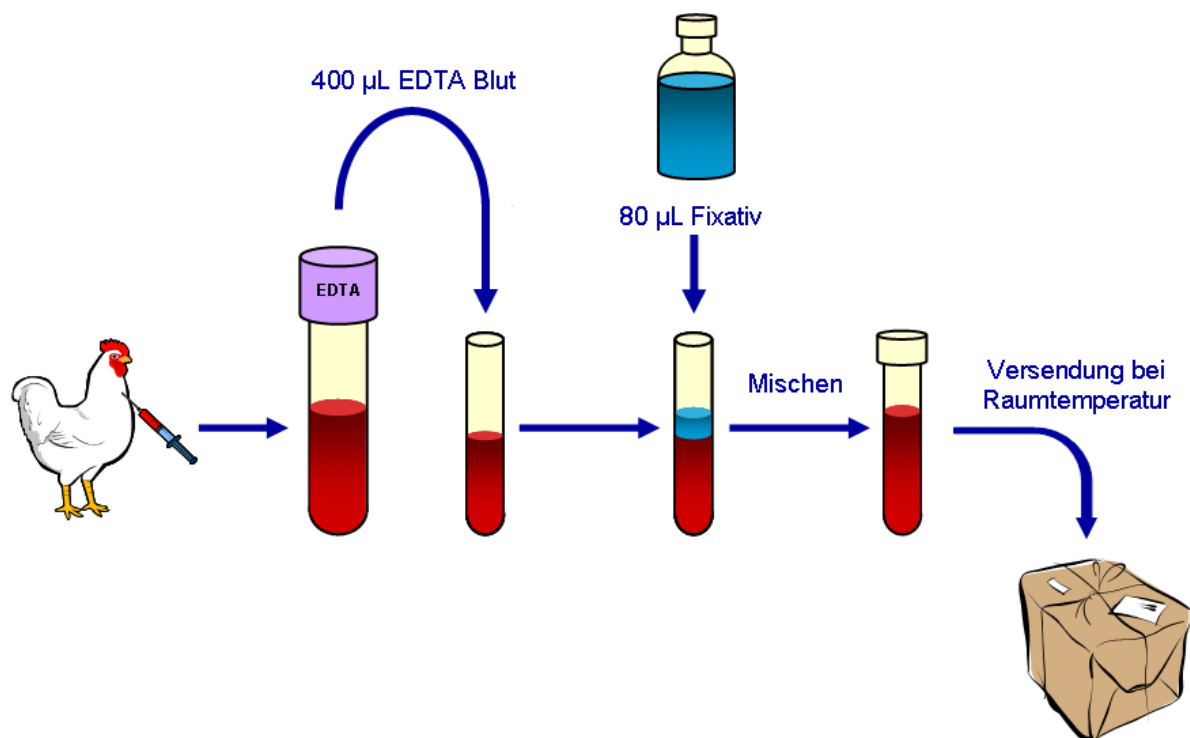


Abb. 52:
Schema: Fixierung von Hühnerblutproben mittels Transfix

Bei der vergleichenden Untersuchung von unfixierten, frisch fixierten und vor über 72 Stunden fixierten Proben wurden keine relevanten Unterschiede festgestellt. Damit wurde gezeigt, dass das neue Verfahren auch bei der Untersuchung von konservierten Proben die erst mehrere Tage nach der Entnahme verarbeitet und analysiert werden zuverlässige Ergebnisse liefert. Dies schafft die Möglichkeit, dass Blutproben über weite Strecken versandt und zentral in einem entsprechend ausgestatteten Labor untersucht werden können.

Angeichts eines fehlenden Goldstandards zur Leukozytenzählung beim Vogel mit dem die „wahren“ in den untersuchten Proben enthaltenen Zellzahlen bestimmt

werden könnten, lassen sich naturgemäß nur begrenzte Aussagen über die absolute Richtigkeit der mit dem neuen Verfahren ermittelten Werte treffen. Im Rahmen der Validierung der Technik konnte allerdings gezeigt werden, dass sich das neue Verfahren im Vergleich mit der Mikroskopie durch eine wesentlich höhere Präzision auszeichnet. Dies rechtfertigt die Einführung der beschriebenen Technik als neuen „Goldstandard“ zur Bestimmung von Gesamtleukozyten- und Thrombozytenzahl sowie zur Differentialblutbilderstellung beim Huhn. Aufgrund ihrer Zuverlässigkeit, der weitgehenden Automatisierung, der einfachen Durchführbarkeit und der geringeren Kosten ist davon auszugehen, dass sich die hier beschriebene Technik in Wissenschaft und Praxis gegenüber den insbesondere in der Vogelhämatologie subjektiven und fehlerbehafteten mikroskopischen Verfahren durchsetzen wird.

Anwendungsmöglichkeiten bieten sich vor allem in der veterinärmedizinischen Diagnostik sowie der immunologischen und infektionsmedizinischen Forschung. Die Bestimmung des zahlenmäßigen Verhältnisses zwischen heterophilen Granulozyten und Lymphozyten wird üblicherweise zur Beurteilung der Stressbelastung bzw. -anfälligkeit von Geflügel genutzt. Durch die vereinfachte und gegenüber der Mikroskopie zuverlässigere Ermittlung dieses Wertes, bieten sich für die neue Technik deshalb auch Einsatzmöglichkeiten in der Tierzucht und im Tierschutz. Weiterhin könnten derartige hämatologische Untersuchungen auch für die Disziplinen Pharmakologie, Toxikologie und Tierernährung von Nutzen sein (Rümke 1977).

Dass durch die Erfinder Möglichkeiten zur kommerziellen Verwertung gesehen wurden, war der Anlass für eine Schutzrechtsanmeldung zu der neuen Technik.

Einzelne bisher nur in aller Kürze diskutierte Aspekte der vorliegenden Arbeit, werden in den folgenden Abschnitten detaillierter erörtert.

6.1 Überlegungen zur Statistik hämatologischer Zählverfahren

Bei der Beurteilung von Techniken zur Zählung und Differenzierung von Leukozyten sollte man sich vorab die statistisch zu erwartende Variabilität bei derartigen Untersuchungsverfahren vor Augen führen. Ausführlich diskutiert wurde die Thematik 1977 auf der College of American Pathologists Conference. Die folgenden Ausführungen orientieren sich größtenteils an der zu diesem Kongress erschienenen Publikation „Differential Leukocyte Counting“ (Rümke 1977).

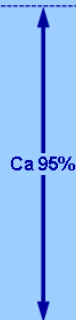
Zur Veranschaulichung des zu erwartenden statistischen Fehlers beim Differentialblutbild wird in den folgenden beispielhaften Betrachtungen von idealen Voraussetzungen ausgegangen:

1. Die Zusammensetzung der Blutzellen im Blutausschlag gleicht der Zusammensetzung der Zellen im Blut des Patienten.
2. Die differenzierten Zellen stellen eine zufällige Stichprobe aller Zellen im Ausschlag dar.
3. Alle Zellen werden korrekt identifiziert.

Vorausgesetzt es würde nun von einer Blutprobe, in der die Lymphozyten tatsächlich 20% ausmachen, eine sehr große Zahl „perfekter“ Ausstriche angefertigt und jeweils 100 Zellen differenziert werden. Dann wäre für die registrierte Anzahl an Lymphozyten unter den 100 differenzierten Leukozyten die in Tab. 7 dargestellte Normalverteilung zu erwarten. Es würden nur in 9,93% der Zählungen exakt 20 Lymphozyten – also 20% gefunden. Zudem würde das Ergebnis der Zählung oft erheblich vom wahren Wert (20%) abweichen. Ungefähr 95% der Zählungen würden zwischen 12% und 28% Lymphozyten ermitteln. Diese Variabilität entspricht Ideal-Bedingungen und ist unvermeidbar. Wie wirkt sich eine Erhöhung der Anzahl der differenzierten Zellen aus?

Diskussion

X	p (in %)
6	< 0.01
7	0.02
8	0.06
9	0.15
10	0.34
11	0.69
12	1.28
13	2.16
14	3.35
15	4.81
16	6.38
17	7.89
18	9.09
19	9.81
20	9.93
21	9.46
22	8.49
23	7.20
24	5.77
25	4.39
26	3.16
27	2.17
28	1.41
29	0.88
30	0.52
31	0.29
32	0.16
33	0.08
34	0.04
35	0.02
36	< 0.01



Tab. 7:

Die Wahrscheinlichkeiten (p) bei der Differenzierung von 100 Leukozyten am Ausstrich (einer Blutprobe mit einem tatsächlichen Gehalt von 20% Lymphozyten) x Lymphozyten zu finden; nach (Rümke 1977)

Tab. 8 gibt an, in welchen Bereichen sich 95% der Ergebnisse befinden, wenn jeweils n Leukozyten in einer großen Anzahl von Ausstrichen ausgezählt werden und der tatsächliche Gehalt an Zellen des untersuchten Leukozytentyps t% beträgt. Da nur Zellen, also ganze Ereignisse gezählt werden, erhalten die angegebenen Spannen nicht exakt sondern nur näherungsweise 95%. Wenn nun eine Blutprobe z.B. 10% Monozyten enthält ($t = 10$), eine große Anzahl an Ausstrichen angefertigt wird und in jedem Ausstrich ($n = 100$) Zellen differenziert werden, liegen die Grenzen des 95% -Vorhersagewert-Intervalls bei 5% und 16%. Das bedeutet, dass ungefähr 95% der Ergebnisse zwischen 5% und 16% liegen werden. Um genau zu sein würden in 2,37% der Fälle weniger als 5 Monozyten gezählt werden und in 2,06% der Fälle mehr als 16. Dies lässt sich aus der Formel der Normalverteilung errechnen. Tab. 8 zeigt darüber hinaus, dass die 95% Vorhersagebereiche kleiner werden, wenn n erhöht wird, also eine größere Anzahl Zellen differenziert wird. Würden in dem beschriebenen Fall also beispielsweise nicht 100 sondern 1000 Zellen differenziert, so würden in 95% der Fälle zwischen 82 und 119 Monozyten entsprechend 8,2 und 11,9% gefunden werden.

Diskussion

t	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1000
1	0 – 3	0 – 2,5	0,2 – 2,0	0,4 – 1,7
2	0 – 5	0,5 – 4	0,8 – 4,4	1,2 – 2,9
3	0 – 7	1 – 5,5	1,6 – 4,6	2,0 – 4,1
4	1 – 8	1,5 – 7	2,4 – 5,8	2,8 – 5,3
5	1 – 10	2 – 8	3,2 – 7,0	3,7 – 6,4
6	2 – 11	3 – 9,5	4,0 – 8,2	4,6 – 7,5
7	2 – 12	3,5 – 10,5	4,8 – 9,4	5,5 – 8,6
8	3 – 14	4,5 – 12	5,8 – 10,4	6,4 – 9,7
9	4 – 15	5 – 13	6,6 – 11,6	7,3 – 10,8
10	5 – 16	6 – 14,5	7,4 – 12,8	8,2 – 11,9
15	8 – 22	10 – 20	12,0 – 18,2	12,8 – 17,2
20	12 – 28	14,5 – 25,5	16,6 – 23,6	17,6 – 22,5
25	17 – 34	19 – 31	21,2 – 22,8	22,3 – 27,7
40	21 – 39	24 – 36,5	26,0 – 34,0	27,2 – 32,9
35	26 – 44	28,5 – 41,5	30,8 – 39,2	32,1 – 38,0
40	31 – 50	33,5 – 47	35,8 – 44,4	37,0 – 43,0
45	35 – 55	38 – 52	40,6 – 49,4	41,9 – 48,1
50	40 – 60	43 – 57	45,6 – 54,4	46,0 – 53,1

Tab. 8:
95%-Vorhersageintervalle (in%) für die Ergebnisse einer sehr großen Anzahl an Differentialblutbildern erstellt an Ausstrichen der gleichen Blutprobe.
n ist die Summe aller differenzierten Zellen; t ist der tatsächliche Prozentsatz des untersuchten Zelltyps; nach (Assendelft, Preston, and Rowan 2001)

Anhand von Tab. 7 und Tab. 8 wurde aufgezeigt, dass ein wahrer Wert z.B. 20% Lymphozyten eine Spanne verschiedener Ergebnisse in der Untersuchung liefern kann. Umgekehrt betrachtet kann aber auch ein bei der Differenzierung von 100 Zellen festgestellter Wert durch eine Spanne verschiedener tatsächlich vorliegender Wert zu Stande gekommen sein. Bei Abschätzung dieses Phänomens hilft Tabelle Tab. 9.

Diskussion

a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1000
0	0 – 4	0 – 2	0 – 1	0 – 1
1	0 – 6	0 – 4	0 – 3	0 – 2
2	0 – 8	0 – 6	0 – 4	1 – 4
3	0 – 9	1 – 7	1 – 5	2 – 5
4	0 – 10	1 – 8	2 – 7	2 – 6
5	1 – 12	2 – 10	3 – 8	3 – 7
6	2 – 13	3 – 11	4 – 9	4 – 8
7	2 – 14	3 – 12	4 – 10	5 – 9
8	3 – 16	4 – 13	5 – 11	6 – 10
9	4 – 17	5 – 14	6 – 12	7 – 11
10	4 – 18	6 – 16	7 – 13	8 – 13
15	8 – 24	10 – 21	11 – 19	12 – 18
20	12 – 30	14 – 27	16 – 24	17 – 23
25	16 – 35	19 – 32	21 – 30	22 – 28
30	21 – 40	23 – 37	26 – 35	27 – 33
35	25 – 46	28 – 43	30 – 40	32 – 39
40	30 – 51	33 – 48	35 – 45	36 – 44
45	35 – 56	37 – 53	40 – 50	41 – 49
50	39 – 61	42 – 58	45 – 55	46 – 54
55	44 – 65	47 – 63	50 – 60	51 – 59
60	49 – 70	52 – 67	55 – 65	56 – 64
65	54 – 75	57 – 72	60 – 70	61 – 68
70	60 – 79	63 – 77	65 – 74	67 – 73
75	65 – 84	68 – 81	70 – 79	72 – 78
80	70 – 88	73 – 86	76 – 84	77 – 83
85	76 – 92	79 – 90	81 – 89	82 – 88
90	82 – 96	84 – 94	87 – 93	87 – 92
91	83 – 96	86 – 95	88 – 94	89 – 93
92	84 – 97	87 – 96	89 – 95	90 – 94
93	86 – 98	88 – 97	90 – 96	91 – 95
94	87 – 98	89 – 97	91 – 96	92 – 96
95	88 – 99	90 – 98	92 – 97	93 – 97
96	90 – 99	92 – 99	93 – 98	94 – 98
97	91 – 100	93 – 99	95 – 99	95 – 98
98	92 – 100	94 – 100	96 – 100	96 – 99
99	94 – 100	96 – 100	97 – 100	98 – 100
100	96 – 100	98 – 100	99 – 100	99 – 100

Tab. 9:

95%-Konfidenzintervalle für verschiedene im Differentialblutbild ermittelte Prozentsätze eines Zelltyps.
n ist die Gesamtzahl aller differenzierten Zellen. **a** ist der beobachtete Prozentsatz des untersuchten Zelltyps. Die Konfidenzintervallsgrenzen 0 und 100 stellen Näherungswerte dar; nach (Assendelft, Preston, and Rowan 2001)

Wenn beispielsweise bei der Differenzierung von 200 Zellen 40 Lymphozyten (= 20%) gezählt werden, waren mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in der Probe tatsächlich zwischen 14% und 27% Lymphozyten vorhanden. Tab. 9 zeigt, dass die 95%-Konfidenzintervalle erwartungsgemäß umso kleiner werden, je mehr Zellen differenziert werden. Ein Vergleich der Werte in den Spalten $n = 100$ und $n = 1000$ verdeutlicht den Vorteil der aus der Erhöhung der Zahl der ausgezählten Zellen erwächst. Die statistische Darstellung liefert damit eine Erklärung für die in zahlreichen Studien festgestellte hohe Präzision verschiedener Hämatologieanalysegeräte die stets eine große Zahl von Zellen differenzieren. Assendelft zeigt an einem fiktiven Musterblutbild die Vorhersageintervalle auch bei

Diskussion

der Differenzierung von 10 000 Zellen (Assendelft, Preston, and Rowan 2001). Die Originalabbildung wurde als Tab. 10 leicht an die Darstellung in Tab. 9 angepasst.

		N = Gesamtzahl differenzierter Zellen			
		100	500	1000	10 000
a = festgestellter Prozentsatz des Zelltyps	1	0 - 5.4	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
	4	1.1 - 9.9	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
	9	4.2 - 16.4	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
	45	35 - 55.3	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
	60	49.7 - 69.7	55.6 - 64.3	56.9 - 63.1	59.0 - 61.0
		95% - Konfidenz-Limits			

Tab. 10:

Die Präzision des Differentialblutbildes in Abhängigkeit von der Gesamtzahl differenzierter Zellen. Die „festgestellten Prozentsätze des Zelltyps“ sind rein zufällig gewählt und stellen kein Differentialblutbild dar; nach (Assendelft, Preston, and Rowan 2001; Burton and Guion 1968; Lucas and Jamroz 1961; Wunder et al. 1992)

Aus Tab. 11 wird ersichtlich, dass erst im Bereich zwischen 8000 und 25 000 gezählten Zellen eines Typs der Variationskoeffizient unter 1% sinkt. Die Höhe des Variationskoeffizienten hängt dabei nicht direkt von der Konzentration des untersuchten Zelltyps ab, sondern von der tatsächlich gezählten absoluten Zahl an Zellen des betreffenden Typs.

Diskussion

gezählte Zellen	STABW	95%- Konfidenzintervall (± 2 STABW)	Variationskoeffizient CV (in %)	Poisson error
10	$\pm 3,2$	4 - 16	32	± 4
25	$\pm 5,0$	15 - 35	20	± 5
50	$\pm 7,1$	36 - 64	14,2	± 8
100	$\pm 10,0$	80 - 120	10	± 10
500	$\pm 22,36$	455 - 545	4,5	± 23
1 000	$\pm 31,62$	937 - 1063	3,2	± 32
2 500	$\pm 50,0$	2400 - 2600	2,0	± 50
8 000	$\pm 89,44$	7801 - 8199	1,1	± 90
25 000	$\pm 158,11$	24684 - 25316	0,6	± 159

Tab. 11:
Abhängigkeit von Standardabweichung (STABW), 95%-Konfidenzintervall, Variationskoeffizient und Poisson error von der Anzahl gezählter Zellen; nach (Goossens, Van Hove, and Verwilghen 1991)

Tab. 12 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Anzahl differenzierter Zellen, der Frequenz des betreffenden Zelltyps und des unter Idealbedingungen zu erwartenden Variationskoeffizienten. Wenn beispielsweise 1000 Leukozyten differenziert werden und der zu untersuchende Zelltyp mit einer Frequenz von 10% vorliegt beträgt der Variationskoeffizient 10%. Soll der Variationskoeffizient auf 5% halbiert werden, müssen vier Mal so viele Zellen (4 000) differenziert werden. Um die Präzision um den Faktor P zu erhöhen, muss die Gesamtzahl analysierter Ereignisse um den Faktor P^2 erhöht werden (Theodorsen 1995; Buttarello et al. 1992; Vives Corrons et al.; Hubl, Hauptlorenz et al. 1995; Hubl, Andert et al. 1995; Hubl et al. 1996; Houwen 2001).

Diskussion

erwünschter Variationskoeffizient (CV) (in %)	1,0	2,5	5,0	10	20
Positive Ereignisse erforderlich:	10 000	1 600	400	100	25
Bei einer Frequenz von:	Gesamtzahl erforderlicher Ereignisse				
%	1: n				
10	10	100 000	16 000	4 000	1 000
1	100	1 000 000	160 000	40 000	10 000
0,1	1 000	10 000 000	1 600 000	400 000	100 000
0,01	10 000	100 000 000	16 000 000	4 000 000	1 000 000
0,001	100 000	1 000 000 000	160 000 000	40 000 000	10 000 000

Tab. 12:

Zusammenhang zwischen der Anzahl differenzierter Zellen, der Frequenz des betreffenden Zelltyps und des unter Idealbedingungen zu erwartenden Variationskoeffizienten; nach (<http://www.cf.ac.uk>)

Diese statistischen Ausführungen machen verständlich, warum auch in der Humanmedizin das traditionelle mikroskopische 100- oder 200-Zell-Differentialblutbild wegen seiner schlechten Präzision, seiner Ungenauigkeit und seiner fehlenden Sensitivität wegen kritisiert wird. Das mikroskopische 800-Zell-Diff das vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) noch vor kurzem als Referenzverfahren empfohlen wurde, ist äußerst zeitaufwändig und wird beispielsweise beim Vorliegen niedriger Monozytenzahlen als unzuverlässig beurteilt (Lilliehook et al. 2004). Deswegen wurde in der Humanmedizin für die Monozytenzählung bereits die Entwicklung eines durchflusszytometrischen Referenzverfahrens zur Beurteilung der mit Hämatologieanalysegeräten ermittelten Monozytenzahlen vorgeschlagen (Bland and Altman 1995, 1986; Westgard et al. 2003; Altman and Bland 1987; Westgard and Hunt 1973).

6.2 Beurteilung der im Methodenvergleich nachgewiesenen signifikanten Unterschiede

Um das neue Verfahren so gut wie möglich zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt und verschiedene Verfahren und statistische Techniken eingesetzt. Mit Hilfe der deskriptiven Statistik sowie der Überprüfung der Übereinstimmung der Ergebnisse aus der durchflusszytometrischen (unfixiert Tag 0/ fixiert Tag 0/ fixiert Tag 3) und der mikroskopischen Untersuchung konnten mittels Wilcoxon-Test bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ für verschiedene Zelltypen signifikante Unterschiede zwischen Mikroskopie und Durchflusszytometrie sowie zwischen den verschiedenen durchflusszytometrischen Verfahren nachgewiesen werden. Demnach unterscheiden sich beispielsweise die durchflusszytometrischen Ergebnisse für Thrombozyten (unfixiert und fixiert Tag 3) signifikant von denen der Mikroskopie.

Dass auch zwischen den verschiedenen durchflusszytometrischen Messungen: (unfixiert Tag 0/ fixiert Tag 0/ fixiert Tag 3) für viele Zelltypen signifikante Unterschiede bestehen, kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass in jeder Einzelmessung so viele Zellen untersucht wurden. Ein Vergleich der Einzelmessungen im Säulendiagramm sowie die deskriptive Statistik offenbaren jedoch, dass diese Unterschiede weitestgehend irrelevant für die Praxis sein dürften. Dass sich die Ergebnisse aus den unfixierten und den fixierten, aber am gleichen Tag nur wenige Stunden später untersuchten, Aliquots bei allen Zelltypen bis auf die Heterophilen signifikant unterscheiden, deutet daraufhin, dass die Ursache für die Unterschiede nicht in einer erhöhten inter-assay Variabilität, beispielsweise durch veränderte Umweltbedingungen, zu suchen ist. Viel wahrscheinlicher ist, dass der Einfluss der Fixierung auf die FSC-H/SSC-H-Eigenschaften der Zellen sowie auf ihre Fluoreszenzmuster hierfür verantwortlich ist.

6.3 Beurteilung der Zuverlässigkeit der durchflusszytometrischen Technik

Um die Ursachen der festgestellten Unterschiede zu finden bzw. um deren Bedeutung zu beurteilen, wurden weitere Techniken der Statistik eingesetzt.

So wird in den folgenden Abschnitten der Versuch gemacht, das neu entwickelte durchflusszytometrische Verfahren unter Berücksichtigung der unter 6.1 dargelegten Prinzipien hinsichtlich seiner Genauigkeit und Präzision zu beurteilen.

6.3.1 Genauigkeit

In der DIN EN 60051 wird die Genauigkeit eines Messgerätes definiert als „Grad der Übereinstimmung zwischen angezeigtem und richtigem Wert“. Idealerweise sollte deshalb eine neue Methode mit dem Goldstandard verglichen werden. Das ist in Ermangelung eines solchen Goldstandards für das weiße Blutbild in der Vogelhämatologie nicht möglich (Bland and Altman 1986). Deshalb wurde stellvertretend der Übereinstimmungsgrad zwischen Mikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht (5.18.).

Allgemein muss dabei angemerkt werden, dass bei den Experimenten zum Übereinstimmungsgrad zwischen den Ergebnissen aus Mikroskopie und Durchflusszytometrie die Resultate der Mikroskopie möglicherweise noch etwas verbessert werden hätten können, wenn von jedem einzelnen Tier der Hämatokrit bestimmt und dieser dann bei der Berechnung der absoluten Zellzahlen berücksichtigt worden wäre. Umgekehrt war die bestmögliche Standardisierung der

Anfertigung der Blutaussstriche (mit vom professionellen Untersucher attestierter herausragender makroskopischer und mikroskopischer Qualität) sowie die Durchführung der Mikroskopie durch einen routinierten Untersucher aber eine Garantie für höchstmögliche Präzision der Ergebnisse, wie sie in der Praxis nicht zu erzielen sein dürfte.

Beim Methodenvergleich wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Berechnung von Korrelationskoeffizienten verzichtet. In der statistischen und medizinischen Fachliteratur wurde ausführlich dargelegt, dass die Berechnung von Korrelationskoeffizienten bzw. die Durchführung von Regressionsanalysen beim Vergleich verschiedener Untersuchungsverfahren nur begrenzte Aussagekraft besitzen und oft zu falschen Schlüssen hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Verfahren führen (Roleff 2004). So wird die Angabe des Korrelationskoeffizienten (r), des Signifikanzniveaus (p) und der Gleichung der Regressionsgerade als Maß für die Übereinstimmung zweier Methoden von Bland und Altman nicht als Mittel der Wahl angesehen (Altman and Bland 1983; Bland and Altman 1995, 1986, 1997). Demgegenüber erlaubt die direkte Betrachtung der Differenzen zwischen den zwei verschiedenen Messmethoden eine bessere Beurteilung der Diskrepanz zwischen zwei Methoden (Jensen and Bantz 1993; Neuerer 2005; Roleff 2004). Üblicherweise erfolgt dies in Form eines „difference plot“, auch bekannt geworden als „Bland-Altman plot“ (Altman and Bland 1983; Roleff 2004). Diese Darstellungsform hat mittlerweile auch Eingang in die veterinärmedizinische Forschung gefunden (Petersen et al. 1997; Dewitte et al. 2002).

Beim difference plot werden die Differenzen der beiden Methoden (A minus B) gegen ihren Mittelwert [$(A$ plus B) geteilt durch 2] aufgetragen. In dieser Darstellung können Ausreißer einfacher identifiziert und systematische Abweichungen leichter erkannt werden. Der Grund dafür, dass die Korrelationsberechnung beim Methodenvergleich in der Medizin dennoch das am häufigsten gebrauchte Verfahren ist, ist nach Bland und Altman darin zu sehen, dass viele Studien ohne professionelle statistische Unterstützung durchgeführt werden, indem Fachbücher nach Verfahren für ähnliche Aufgabenstellungen durchsucht oder die Lösungen bereits publizierter Artikel unkritisch übernommen werden (Assendelft, Preston, and Rowan 2001). Folgend den Empfehlungen der genannten Autoren beinhalten die in dieser Arbeit enthaltenen difference plots auch die Linie des mittleren Unterschieds zwischen den Methoden sowie zwei Linien (2s-limits), die die negative und die positive zweifache

Standardabweichung der Unterschiede zwischen den beiden Verfahren abbilden. Der Ansatz nach Bland und Altman zum Vergleich zweier Methoden beinhaltet auch den oftmals vergessenen Abgleich der errechneten 2s-limits mit der aus der Sicht des Kliniklers akzeptablen Abweichung zwischen den beiden Verfahren (Assendelft, Preston, and Rowan 2001). Nur wenn die 2s-limits innerhalb der zu tolerierenden Abweichung liegen, sind die beiden Verfahren als austauschbar zu betrachten. Eine detaillierte Betrachtung der Unterschiede zwischen Mikroskopie und den verschiedenen durchflusszytometrischen Protokollen für jeden einzelnen Zelltyp würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen und wäre auch nur bedingt sinnvoll. Um dem Anspruch auf Vollständigkeit dennoch zu genügen, sind alle erstellten difference plots im Anhang abgebildet. Dies ermöglicht das Nachschlagen und schnelle Erfassen des Sachverhalts bei neu auftretenden Fragen die sich z.B. im Rahmen von in der Zukunft durchgeführten Folgeexperimenten ergeben könnten. Zusammenfassend sollen an dieser Stelle aber einige Schlussfolgerungen aus der Analyse der Bland-Altman plots der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

So kann unter anderem festgehalten werden: In vielen Fällen (z.B. für die Thrombozyten) liegen die 2s-limits für die Unterschiede zwischen Mikroskopie und Zytometrie weit außerhalb der aus klinischen Gesichtspunkten tolerierbaren Abweichungen. Dies ist aber aufgrund der schlechten Präzision der Mikroskopie auch nicht anders zu erwarten.

Dass die Beurteilung der absoluten Genauigkeit eines neuen Verfahrens nicht ohne weiteres durch den Vergleich mit den Resultaten eines „Referenzverfahrens“ mit erheblich schlechterer Präzision erfolgen kann, liegt in der Natur der Sache und ist auch in der Literatur beschrieben (Westgard et al. 2003). Parallele Beurteilungen sind aus dem Vergleich der Ergebnisse von Hämatologieanalysegeräten mit denen von 400-Zell-Differentialblutbildern bekannt (Hubl et al. 1997; Buttarello et al. 1992; Swaim 1991). Somit konnten die angestellten Vergleiche kein zuverlässiges Urteil darüber erlauben, ob das neue durchflusszytometrische Verfahren korrekte Ergebnisse liefert oder nicht.

Aus den difference plots lässt sich aber eine andere wichtige Information ableiten: Die gemittelten Ergebnisse der verschiedenen durchflusszytometrischen Protokolle liegen fast durchweg näher beinander als die zwischen Durchflusszytometrie und Mikroskopie. Dies deutet bereits eine höhere Präzision der Durchflusszytometrie an und weist indirekt darauf hin, dass die teilweise nicht ausreichende Übereinstimmung

zwischen Durchflusszytometrie und Mikroskopie auf die hohe Streuung des mikroskopischen Verfahrens zurückzuführen sein dürfte. Diese Interpretation wird unterstützt durch die Analyse der modifizierten Bland-Altman plots die sich in dieser Arbeit finden (s. Anhang). In ihnen werden die Unterschiede zwischen einem Verfahren und dem Mittelwert der drei durchflusszytometrischen Protokolle abgebildet. In den meisten derartigen plots bei denen nur innerhalb der Zytometrie verglichen wird, liegen die 2s-limits - im Gegensatz zum Vergleich zwischen Mikroskopie und Zytometrie - innerhalb der aus klinischer Sicht tolerierbaren Abweichungen.

6.3.2 Präzision

Auch wenn anhand der vorliegenden Ergebnisse aufgrund des fehlenden Goldstandards keine klare Aussage über die absolute Richtigkeit der mit dem neuen Verfahren ermittelten Werte getroffen werden kann (s. 6.3.1), so besteht doch eine andere Möglichkeit die Zuverlässigkeit der neuen Technik zu beurteilen.

Das zweite und beim Fehlen eines Goldstandards entscheidende Maß für die Zuverlässigkeit eines Verfahrens stellt die Präzision dar. Sie drückt die Streuung der Messwerte eines Verfahrens unabhängig vom „wahren“ Wert aus (Rümke 1977). Aus dem oben diskutierten Experiment zur Untersuchung der Vergleichbarkeit der Meßmethoden ergaben sich bereits Anhaltspunkte für die unterschiedliche Präzision von Mikroskopie und Zytometrie.

Deshalb erfolgt an dieser Stelle ein detaillierter Vergleich der Präzision des neuen Verfahrens mit der Präzision der Mikroskopie. Als Maß für die Präzision lassen sich dabei die in den Experimenten zur intra-assay Variabilität experimentell ermittelten Variationskoeffizienten heranziehen (Tab. 5, Tab. 6).

In der vergleichenden Darstellung fällt auf, dass die Variationskoeffizienten der Durchflusszytometrie für alle Zelltypen erheblich niedriger sind als die der Mikroskopie (Abb. 43). Angesichts der unter 6.1 angestellten statistischen Überlegungen war dies zu erwarten. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden in absoluten Zahlen pro Ausstrich je nach Huhn und Zelltyp zwischen ca. 10 (Eosinophile) und 1000 (Thrombozyten) Zellen detektiert. Unter idealen Voraussetzungen wäre bei derartigen Stichproben mit Variationskoeffizienten in einer Größenordnung zwischen 3,2 und 32% zu rechnen. Mit Werten zwischen 12,5% (Thrombozyten) und 34,7% (Basophile) sind die tatsächlichen Variationskoeffizienten der Mikroskopie teilweise aber um ein Vielfaches höher. Die Fehlerquellen die dafür

verantwortlich sein dürften, wurden bereits unter 3.6 ausführlich beschrieben. Wichtig ist in diesem Zusammenhang der Hinweis, dass die Experimente zur Präzisionsbestimmung der Mikroskopie unabhängig von der Bestimmung des Hämatokrits sind, da es hier nicht auf die absolute Höhe der Zellzahlen sondern auf die Übereinstimmung zwischen einzelnen Zählungen/Schätzungen einer einzigen Blutprobe ankam. Dies bedeutet, dass die Präzision im Gegensatz zur Genauigkeit auch nicht durch eine Bestimmung des Hämatokrits der untersuchten Probe hätte gesteigert werden können (6.3.1).

Die Variationskoeffizienten der Durchflusszytometrie sind mit Werten zwischen 2,7% (Lymphozyten) und 16,6% (Basophile) erheblich niedriger als die der Mikroskopie. Auch dies ist aufgrund der höheren Zahl detektierter Zellen zu erwarten. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden in absoluten Zahlen pro Messung je nach Huhn und Zelltyp zwischen ca. 30 (Eosinophile) und 7000 (Thrombozyten) Zellen detektiert. Bezieht man sich bei der Beurteilung auch hier auf die unter idealen Bedingungen zu erzielenden Werte, so würde man Variationskoeffizienten zwischen 1,1% (Thrombozyten) und 20% (Basophile) erwarten. Damit liegen die für die Durchflusszytometrie ermittelten Variationskoeffizienten bereits sehr nahe bei dem unter Idealbedingungen möglichen Optimum. Angesichts des fehlenden „Goldstandards“ ist dies eine bedeutende Beobachtung, die als Rechtfertigung dafür dienen kann, das neue Verfahren fortan als Referenzverfahren zu betrachten. Die vorhandenen Abweichungen vom Ideal lassen sich indes leicht erklären. Denn trotz der hohen Anzahl gezählter Zellen und der oben beschriebenen Vorteile sind auch die automatisierten Verfahren zur Leukozytenzählung und -differenzierung fehlerbehaftet. So wurde sogar schon über „desaströse Ergebnisse“ der automatisierten Basophilenzählung mit Hämatologie-Analysegeräten berichtet (Mironova 2004; Zerbe et al. 2003). Dem liegt zu Grunde, dass auch bei automatisierten Verfahren sogenannte „Maschinenfaktoren“ dazu führen, dass Präzision und Richtigkeit weit entfernt vom Ideal liegen können (Hubl et al. 1997). Solche Fehler sind häufig durch die selektive Adhärenz von bestimmten Zelltypen bedingt. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass bei dem vorgestellten Verfahren durch eine zeitnah nach der Blutentnahme stattfindende Fixierung größere Probleme durch den Verlust von Zellen aufgrund einer Adhärenz an Oberflächen vermieden werden können. Dies rechtfertigt auch den Verzicht auf weitere Maßnahmen zur Adhärenzminimierung, wie sie in der Literatur beispielsweise für

Arbeiten mit isolierten Granulozyten beschrieben wurden (Lape'-Nixon and Prince 1996). Eine weitere bekannte Fehlerquelle stellen die Koinzidenzphänomene dar. Wenn Zellaggregate auftreten oder zwei oder mehrere Zellen nebeneinander oder in zu geringem Abstand den Messkanal passieren, werden deren Signale als eine Zelle interpretiert und liefern fehlerhafte Messwerte (Assendelft, Preston, and Rowan 2001).

Da bei den Versuchen zur Bestimmung der Präzision noch nicht revers pipettiert wurde und auch keine Fixierung erfolgte, ist davon auszugehen, dass die Präzision des Verfahrens nach Implementierung dieser Erweiterungen bereits über das hier nachgewiesene Maß gesteigert wurde. Bis auf die Variationskoeffizienten von Monozyten (12,5%) und Basophilen (16,6%) lassen sich aber bereits hier die Variationskoeffizienten durchaus als tolerabel beurteilen. Bezüglich der erforderlichen Zahl gemessener Zellen eines Typs können Richtwerte aus der in der Humanmedizin durchgeführten durchflusszytometrischen CD4⁺-T-Lymphozyten-Zählung als Orientierung dienen. Hier wird die Identifizierung von 500 - 2500 Zellen der untersuchten Population in einer Probe als ausreichend angesehen (Houwen 2001; Grimaldi et al. 2005; Hubl et al. 1997). Entsprechend Tab. 12 wären dabei unter idealen Voraussetzungen Variationskoeffizienten zwischen 4,5% und 2% zu erwarten. So bleibt festzuhalten, dass das hier vorgestellte Verfahren bereits in dieser ersten Validierung für Thrombozyten, Gesamtleukozyten, Lymphozyten und T-Lymphozyten Variationskoeffizienten aufweist, die den strengen Standards für vergleichbare Untersuchungen in der Humanmedizin genügen. Sollten besondere Anwendungen tatsächlich noch präzisere Messungen erforderlich machen, könnte zur Erhöhung der Präzision die Messdauer gemäß den eigenen Untersuchungen hierzu (s. 5.15) bis auf 10 min erhöht und damit die Zahl der erfassten Zellen etwa verdreifacht werden. Dies könnte beispielsweise leicht automatisiert erfolgen durch Implementierung eines Algorithmus in der Steuerungssoftware des Durchflusszytometers, der gewährleistet, dass beim Vorliegen niedriger Zellzahlen die Messdauer entsprechend verlängert wird (Young et al. 1994; Vainio et al. 1991).

Abschließend lässt sich aus der statistischen Analyse schlussfolgern:

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen durch eine objektivierbare, durchflusszytometrische Technik die subjektive, fehleranfällige, mikroskopische Zellidentifizierung und die ungleichmäßige Zellverteilung im Blutausschlag, die bei der

mikroskopischen Zählung selbst beim 1000- oder 10 000-Zell-Differentialblutbild zu unbefriedigenden Ergebnissen führen kann, zu umgehen (Viertlboeck and Gobel 2007).

6.4 Optionen zur Weiterentwicklung des Verfahrens

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Optionen zur Weiterentwicklung des neuen Verfahrens diskutiert. Unter anderem werden Möglichkeiten zur Identifizierung weiterer Leukozytensubpopulationen, zur Untersuchung von Blut anderer Vogelspezies, zur Reduktion der Komplexität des Verfahrens, sowie zur Erhöhung der Wirtschaftlichkeit der Technik erörtert.

6.4.1 Reduktion der Komplexität des Verfahrens

Aufgrund des modularen Aufbaus der Durchflusszytometrie bestehen vielfältige Möglichkeiten zur Variation bzw. Weiterentwicklung etablierter Untersuchungsverfahren. An dieser Stelle werden Ideen aufgezeigt deren Umsetzung möglicherweise zu einer Vereinfachung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahrens führen könnte.

6.4.1.1 Modifikation der Färbung durch Einsatz anderer Fluorochrome

Durch den Einsatz von in der jüngeren Vergangenheit verfügbar gewordenen Fluorochromen wie dem gegenüber PerCP helleren PE-Alexa Fluor 700 könnten möglicherweise noch Verbesserungen erzielt werden. In diesem Falle müsste aber auf jeden Fall der hohen Lichtempfindlichkeit derartiger Tandem-Konjugate Rechnung getragen werden. Durch den Einsatz von Alexa Fluor 488 statt FITC könnten die Lymphozyten möglicherweise noch stärker angefärbt werden. So könnte unter Umständen ein α CD3-PE-Alexa Fluor-Konjugat ausreichend stark färben, um gleich vier Antikörper (α CD8 α -FITC, α CD4-FITC und α TCR $\gamma\delta$ -FITC) im Sinne einer Vereinfachung der Färbung zu ersetzen.

6.4.1.2 Modifikation der Färbung durch Einsatz anderer monoklonaler Antikörper

Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass durch den Einsatz bisher nicht getesteter monoklonaler Antikörper eine Vereinfachung der Färbung erreicht werden kann. So könnte sich beispielsweise die Kombination aus α CD28 (Klon 2-4) und α TCR $\gamma\delta$ als geeignet zur Lymphozytenmarkierung erweisen. Zudem könnte geprüft werden, ob

der mAK HUH73A tatsächlich als Panlymphozytenmarker einzusetzen ist, der alle T- und B-Zellen detektiert (Morgenroth 2007; Kothlow et al. 2008). Sollte dies der Fall sein und keine Kreuzreaktivität mit anderen Leukozyten bestehen, könnte dieser Marker die bisher eingesetzten Lymphozytencocktails ersetzen. Es besteht zudem die Hoffnung, dass aufgrund einer möglichen Kreuzreaktivität die bereits für zahlreiche Säugerspezies beschrieben ist, dann eine Vogelspeziesübergreifende Identifizierung der Summe aller Lymphozyten möglich wäre (<http://www.vetmed.wsu.edu>).

Zudem sollte untersucht werden, wie sich ein Verzicht auf KUL01 auf die Untersuchung fixierter Proben auswirkt. Auch könnte K1 durch einen Marker, der ausschließlich Thrombozyten färbt, wie α CD41/61 (11C3) oder α CD51/CD61 (23C6), ersetzt werden. Denn vielleicht wäre durch den vollkommenen Verzicht auf Monozytenmarker sogar eine bessere Monozytendarstellung möglich, wenn die Monozyten dann als einzige CD45^{hoch+}-Zellen weder durch K1 noch durch die FITC-konjugierten Lymphozytenmarker angefärbt werden.

Angesichts der in verschiedenen Experimenten auffallend unterschiedlich starken KUL01-Färbung der Monozyten sollte untersucht werden, ob hier unterschiedliche Aktivierungszustände, Unterschiede zwischen verschiedenen Hühnerlinien, Lebensalter der Versuchstiere oder andere Faktoren beteiligt sind. Die verringerte FL2-H-MFI der Monozyten bei der Untersuchung Transfix-stabiler Blutproben deutet daraufhin, dass das korrespondierende Antigen nicht fixierungsstabil ist. Eine möglicherweise fixierungsstabile Alternative zur KUL01-Färbung steht mit einem laboreigenen gegen gal-8 gerichteten Antikörper zur Verfügung. Eine weitere Option stellt der α CD40 Klon AV79 dar, der nach Angaben der Vertriebsfirma unreife und reife B-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen detektiert. Probleme könnten sich hier allerdings durch eine Kreuzreaktion mit T-Lymphozyten ergeben (Gobel et al. 1994; Gobel, Chen, and Cooper 1996; Gobel, Kaspers, and Stangassinger 2001; Rogers et al. 2005; Viertlboeck et al. 2008).

6.4.2 Modifikation der Färbung durch Änderung der Fluorochrom-Antikörper-Kombinationen

Um die Robustheit des Verfahrens zu steigern, könnte versucht werden die Qualität der Färbung weiter zu erhöhen. Insbesondere der CD45-Färbung kommt hier entscheidende Bedeutung zu. Eine bessere Separation der schwach CD45-positiven Leukozyten von den Erythrozyten wäre wünschenswert. Die Messungen wären dann

noch leichter auszuwerten und die Genauigkeit des Verfahrens würde durch eine geringere Kontamination der CD45-positiven Population mit falsch-positiven Erythrozyten erhöht werden. Möglicherweise können durch einen Tausch der Fluorochrom-Antikörperkombinationen bessere Resultate erzielt werden. Denn beim Einsatz des α CD45-FITC-Konjugats gelang eine wesentlich deutlichere Abgrenzung zwischen CD45⁻ und CD45⁺ Zellen. Käme das CD45-FITC-Konjugat zum Einsatz, müsste bei Verwendung eines Dreifarb-Zytometers allerdings mindestens ein weiteres Fluorochrom getauscht werden. Denkbar erscheint folgende Variante: α CD45-RPE, K1-PerCP und FITC-konjugierte Lymphozytenmarker. Vermutlich würde ein K1PerCP-Konjugat noch eine ausreichende Färbung der Thrombozyten sicherstellen. Die Anfärbung der Monozyten wäre aber wohl kaum mehr nachzuweisen. Diese könnten möglicherweise aber immer noch über die anderen Messparameter identifiziert werden. Dass die verschiedenen Lymphozytenmarker auch als RPE-Konjugate erfolgreich einsetzbar sind, ist aufgrund der Helligkeit des RPE wahrscheinlich. Somit sollte auch die Färbung mit der Kombination α CD45-RPE, K1-FITC und RPE-konjugierte Lymphozytenmarker getestet werden. Ob sich die Qualität der Färbungen auf diesem Wege tatsächlich weiter optimieren lässt, kann nur experimentell überprüft werden.

6.4.3 Weitere Optionen zur Modifizierung der Färbung

Eine noch bessere Trennung zwischen den Populationen von B- und T-Lymphozyten könnte durch die Erhöhung der eingesetzten BU1-FITC-Konzentration erreicht werden. Bei Verwendung eines Durchflusszytometers mit 2 oder mehr Lasern lässt sich die Färbung erweitern. So kann z.B. bei Verwendung eines im vierten Fluoreszenzkanal detektierten Konjugates eine zusätzliche Zellpopulation getrennt erfasst werden. Denkbar wäre z.B. die Kombination α CD3-FITC, K1RPE/KUL01-RPE, α CD45-PerCP und BU1-APC. Durch Einsatz modernster Durchflusszytometer können bis zu 18 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig eingesetzt und damit eine Vielzahl verschiedenster Zellpopulationen zur Darstellung gebracht werden (Maxwell 1980; Maxwell and Burns 1986). Auf diese Weise könnten z.B. die verschiedenen Lymphozytenpopulationen separat identifiziert und quantifiziert werden.

6.4.4 Erweiterung der Leukozytendifferenzierung durch Identifizierung weiterer Subpopulationen

Durch Einsatz von Markern gegen derzeit noch nicht identifizierte Zellen (eosinophile Granulozyten, NK-Zellen etc.) könnte die Leukozytendifferenzierung ausgeweitet werden (Macrae and Spitznagel 1975; Cohn and Hirsch 1960). Die Grundlage dafür schafft das Verfahren selbst durch die bereits weitreichende Differenzierung der Leukozyten in der hier dargestellten Form. Bei Verwendung eines Zellsorters und der Nutzung der oben beschriebenen Färbungen können fragliche oder näher zu charakterisierende Zellpopulationen isoliert und zur weiteren Untersuchung bzw. Generierung spezifischer monoklonaler Antikörper genutzt werden. Wenn es gelänge auf diesem Wege Marker für Heterophile, Basophile und Eosinophile zu identifizieren, könnte einerseits die Technik der Leukozytendifferenzierung erweitert werden. Andererseits könnten diese Marker bei vielen anderen Fragestellungen und Techniken der Hühnerimmunologie zum Einsatz kommen. Eine experimentell ausgelöste Eosinophilie könnte möglicherweise dabei helfen die Population der eosinophilen Granulozyten zu identifizieren, sowie diesen Zelltyp in ausreichender Menge zu isolieren. In der Folge könnten Mäuse mit den Zellen immunisiert werden, um monoklonale Antikörper gegen aviäre Eosinophile zu generieren (Leutz, Beug, and Graf 1984; Leutz et al. 1989; Santos et al. 2006). Gleiches gilt für die Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen heterophile Granulozyten. Neben den bereits genannten Möglichkeiten zur Erzeugung einer Heterophilie könnten auch aus experimentell induziertem Peritonealexsudat Heterophile gewonnen werden (Kogut et al. 2005; Kogut, Rothwell, and Kaiser 2003; Andreasen and Latimer 1989; Latimer, Kircher, and Andreasen 1989; Andreasen and Latimer 1990; Kogut et al. 1995; Kogut et al. 1998; Kogut, Genovese, and Lowry 2001; Kogut, Genovese, and Nisbet 2001; Kogut, Lowry, and Farnell 2002; He et al. 2006; Kaiser et al. 2000; Farnell et al. 2003). Möglicherweise lässt sich eine Heterophilie auch durch Verabreichung des granulozytenstimulierenden Faktors auslösen (Alvarez-Larran et al. 2005). Eine Anreicherung der Heterophilen aus Blut oder anderem Material könnte mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren erfolgen (Pierre 2002).

Sofern die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Färbetechnik auf Zellsorter übertragen werden soll, sind jedoch unbedingt die Besonderheiten der eingesetzten Fluorochrome zu berücksichtigen. Insbesondere PerCP ist bei verschiedenen Sortern

aufgrund seiner Anfälligkeit für „photobleaching“ nur bedingt verwendbar. Daher empfiehlt sich hier möglicherweise der Ersatz des α CD45-PerCP-Konjugates durch einen mit einem anderen Farbstoff gekoppelten Antikörper. Da bei der Zellsortierung keine absolute Quantifizierung erforderlich ist, kann sogar auf indirekte Färbeverfahren mit Waschschritten zurückgegriffen werden. Hier bietet sich die Verwendung eines Biotin-markierten α CD45 an. In Verbindung mit diesem könnte abhängig vom eingesetzten Sorter der am besten geeignete Farbstoff als Streptavidinkonjugat zum Einsatz kommen. Aufgrund der stärkeren Färbeintensität durch die indirekte Färbung in Kombination mit Waschschritten ist dabei zudem eine sehr deutliche CD45-Differenzierung zu erwarten, die wiederum ein gutes Zellseparierungsergebnis ermöglicht.

6.4.5 Durchflusszytometrischer Nachweis des Aktivierungszustandes von Blutzellen

Wenn weitere Fluoreszenzkanäle zur Verfügung stehen, könnte auch untersucht werden, ob mit dem hier beschriebenen Verfahren morphologische Veränderungen der Zellen sichtbar gemacht werden können (Assendelft, Preston, and Rowan 2001). Analog zu Entwicklungen in der Humanmedizin könnten auf diesem Wege weitere Zelltypen sowie verschiedene Reifungs- und Differenzierungsstadien von Blutzellen unterschieden werden, die teilweise mikroskopisch nicht identifiziert werden können (Jani et al. 2001; Janossy, Jani, Bradley et al. 2002; Storie, Sawle, Goodfellow et al. 2003; Storie, Sawle, Whitby et al. 2003; Walker et al. 2006; Glencross et al. 2002; Glencross et al. 2008; Sherman et al. 1999; Janossy, Jani, Kahan et al. 2002). Denkbar erscheint beispielsweise den Aktivierungszustand von Zellen zu überprüfen indem Antigene gefärbt werden, die bei der Aktivierung des jeweiligen Zelltyps hochreguliert werden. Beispielhaft sei hier an den Einsatz des α CD275 Klon IAH:F676:BE3 gedacht. Nach den Herstellerangaben (Serotec) wird CD275 (LICOS) durch inflammatorische Cytokine auf B-Lymphozyten und Makrophagen hochreguliert. Die Etablierung derartiger Techniken könnte erneut völlig neue Einblicke in die Vogelhämatologie liefern.

6.4.6 Erhöhung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens

Assendelft stellt fest, dass die durchflusszytometrische Erstellung des Differentialblutbildes zu arbeitsaufwändig und zu teuer sei, um als Routineverfahren eingesetzt werden zu können (Storie, Sawle, Goodfellow et al. 2003; Storie, Sawle,

Whitby et al. 2003; Walker et al. 2006; Bergeron et al. 2002). Dies mag für die Humanmedizin gelten, da hier mit den Hämatologieanalysegeräten andere zuverlässige, automatisierte und kostengünstigere Methoden zur Verfügung stehen. In der Vogelhämatologie ist dies jedoch nicht der Fall. Die Kosten von etwa 30 Euro für eine mikroskopische Differentialblutbilderstellung und Schätzung der Gesamtleukozytenzahl übersteigen die bei der automatisierten Routine-Untersuchung von Humanblut mittels Hämatologieanalysegeräten bei weitem. Zudem könnten durch verschiedene Modifikationen des Verfahrens, wie sie auch im Rahmen der durchflusszytometrischen HIV-Diagnostik in Entwicklungsländern zum Einsatz kommen, die Kosten der durchflusszytometrischen Untersuchung weiter gesenkt werden (Storie, Sawle, Whitby et al. 2003). Dies gilt z.B. für den Verzicht auf beads zur absoluten Quantifizierung bei Benutzung eines Durchflusszytometers mit der Fähigkeit zum True Volumetric Counting wie dem CyFlow ML oder dem Cyflow Space, Partec bzw. die Anwendung der Flussratenkalibrierung (Latimer et al. 1988; Feldman et al. 2000). Die Flussratenkalibrierung wurde bereits für die CD4⁺-T-Lymphozytenzählung auf ihre Zuverlässigkeit überprüft (Li et al. 1999; Luhtala 1998). Das Verfahren beruht auf der Ermittlung der Flussrate des verwendeten Durchflusszytometers mit Hilfe von beads. Zu den eigentlich zu untersuchenden Proben werden keine beads mehr zugegeben. Stattdessen wird zu Beginn und am Ende einer Messreihe von beispielsweise 20 Proben jeweils eine Probe mit beads gemessen. Liegen die dabei ermittelten Flussraten innerhalb der vorher festgelegten Toleranz werden die absoluten Zellzahlen aus den ermittelten Flussraten und der Messdauer für die in der Zwischenzeit gemessenen Proben errechnet. Damit werden z.B. für 20 Proben statt 20 nur noch 2 TruCOUNT Tubes benötigt.

Die hier beschriebene Variante des neuen Verfahrens zur Blutbilderstellung beim Huhn ermöglicht die Erstellung eines Differentialblutbildes mit einem Durchflusszytometer mit nur einem Laser und 3 Fluoreszenzkanälen wie z.B. dem FACScan von Becton Dickinson. Es gestattet damit auch die Nutzung älterer bzw. kostengünstiger Geräte.

Durch den Einsatz leistungsfähigerer Durchflusszytometer könnten sich allerdings erhebliche Kosteneinsparungen realisieren lassen. Bei Verwendung eines modernen Durchflusszytometers wie dem CyAn ADP 7/9 Color (Beckman Coulter) mit Flussraten von bis zu 50 000 Zellen pro Sekunde ließe sich z.B. die Messzeit im Vergleich zum FACScan (3500 ev/s) deutlich verkürzen. Dies könnte die

Wirtschaftlichkeit des Verfahrens verbessern bzw. bei der Erreichung höherer Zellzahlen je Messung die Genauigkeit der Einzelmessung erhöhen. Durch den Einsatz eines Autoloaders (als Karussell für Röhrchen oder im 96-Lochplattenformat) könnte der Personalaufwand verringert und damit ebenfalls die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens verbessert werden. Durch die Zuhilfenahme von Software zur automatisierten Daten-Auswertung, deren Funktionen über die von FlowJo hinausgehen, ließe sich die Technik vielleicht noch weiter objektivieren und vereinfachen. Besonders effektiv wäre dabei eine Funktion zur automatisierten Anpassung der gates als Reaktion auf Schwankungen der Messsignale zwischen verschiedenen Proben.

6.4.7 Untersuchung von Blut anderer Vogelspezies

Schon in der Vergangenheit wurde der Großteil der bisherigen hämatologischen Forschung an Nutzgeflügel durchgeführt. Diese Arbeiten sind aber nicht nur von Belang für die Geflügelindustrie. Schließlich kann das Huhn - trotz speziesspezifischer Unterschiede - hinsichtlich der hämatologischen Forschung als Modell für andere Vogelspezies dienen (Luhtala et al. 1997; Li et al. 1999).

Besonders vorteilhaft wäre aber eine Weiterentwicklung des hier beschriebenen Verfahrens die auch eine Analyse des Blutes anderer Vogelspezies gestattet. Dies gilt natürlich ganz besonders für andere wirtschaftlich bedeutende Gelügelpezies wie Pute, Ente und Gans aber auch für Zier- und Zoovögel.

Schließlich erfreuen sich z.B. Papageien großer Beliebtheit als Haustiere. Aufgrund ihrer Intelligenz, ihres Sozialverhaltens, ihres hohen möglichen Lebensalters und nicht zuletzt der Fähigkeit einiger Spezies die menschliche Sprache zu imitieren, bauen viele Besitzer sehr enge emotionale Bindungen zu diesen Tieren auf. Im Krankheitsfall scheuen sie deshalb weder Kosten noch Mühen und erwarten in zunehmendem Maße von ihrem Tierarzt eine medizinische Versorgung auf höchstem Niveau, wie sie früher allenfalls Hund und Katze zu Teil wurde. Abgesehen von wenigen Spezialisten verfügen die meisten praktischen Tierärzte nicht über ausreichende Kenntnisse in der Vogelhämatologie, um Vogelblut mikroskopisch korrekt beurteilen zu können. Kommerzielle Labors untersuchen Einsendungen entweder mit Hilfe der dafür nicht geeigneten Hämatologie-Analyse-Geräte oder sie wenden die fehlerbehafteten mikroskopischen Verfahren an. Ähnlich wie die Papageien stellen auch zur Beizjagd abgerichtete Greifvögel einen hohen Wert für ihre Besitzer dar. Deshalb erfolgt auch bei diesen Spezies oftmals eine umfangreiche

medizinische Versorgung. So sind beispielsweise tierärztliche Ankaufsuntersuchungen, wie sie bisher nahezu ausschließlich aus dem Sportpferdebereich bekannt waren, auf diesem Gebiet der Vogelmedizin mittlerweile durchaus üblich. Ähnlich der Situation im Ziervogelsektor besteht hier im Rahmen der Tierärztlichen Diagnostik Bedarf nach einer zuverlässigeren Technik zur Erstellung des weißen Blutbildes bei den betreffenden Spezies. Erste Tests im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten Anhaltspunkte dafür, dass das Verfahren der Blutuntersuchung mittels DiOC₅(3) auch die Analyse des Blutes von Zier-, Zoo- und Greifvögeln erlauben könnte - möglicherweise aber nur mit technischen Erweiterungen (siehe unten). Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben verschiedener Spezies waren bereits unbestimmte Zeit vor der Messung entnommen worden, so dass möglicherweise eine zu lange Lagerung für die Resultate mitverantwortlich sein könnte. Hinzu kommt, dass es sich um Blutproben von zum Teil lebensbedrohlich erkrankten Patienten handelte, bei denen möglicherweise schwerste hämatologische Veränderungen eingetreten waren. Sowohl bei den Ergebnissen der Proben der Greifvögel als auch bei denen der Papageien fällt auf, dass die Population der Granulozyten deutlich mehr Zellen enthält als bei den Messungen von Hühnerblut. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass diese Vogelspezies im Gegensatz zum Huhn über höhere Granulozytenzahlen verfügen.

Für einige der verfügbaren und teilweise auch für diese Arbeit eingesetzten monoklonalen Antikörper ist bekannt, dass sie mit den entsprechenden Antigenen anderer Vogelspezies kreuzreagieren. Die Feststellung von Kreuzreaktivitäten bzw. die Generierung entsprechender Antikörper könnte dazu führen, dass die Technik nach dem Austausch der nicht kreuzreagierenden α -Huhn-mAKs bei weiteren Spezies angewendet werden kann.

Kreuzreaktivität mit Zellen von Präriehühnern bzw. Truthühnern wurde bereits beschrieben für die α CD8-Klone 3-292 (Paramithiotis, Tkalec, and Ratcliffe 1991), 3-298 (Luhtala et al. 1993) und EP72 (Luhtala et al. 1993), sowie für die α CD4-Klone 2-35 (Chung, Lillehoj, and Jenkins 1991; Bohls et al. 2006), 7-125 (Kothlow et al. 2005) und CT4. sowie für K1 und K55 (Horton et al. 1985). K1 reagiert mit Thrombozyten und Monozyten von Enten (Chung, Lillehoj, and Jenkins 1991) was für eine hohe Konservierung des korrespondierenden Antigens zwischen verschiedenen Vogelspezies spricht. Der gegen CD51/61 gerichtete Klon C23C6 detektiert sogar

humane Zellen (Kyes 1929). Es bleibt zu untersuchen, ob mit den genannten Antikörpern z.B. bei der relativ nahe mit dem Huhn verwandten Pute ein weißes Blutbild erstellt werden kann. Mit Hilfe der Klone K1 oder 23C6 könnte eine Bestimmung der Gesamtleukozyten- und Thrombozytenzahl mit teilweiser Leukozytendifferenzierung bei verschiedenen Spezies möglich sein, sofern einer der bekannten Panleukozytenmarker kreuzreagiert bzw. ein anderer passender Antikörper neu hergestellt wird. Es sollte also überprüft werden, ob die Kreuzreaktivität mit CD45 anderer Vogelspezies bei K55 oder K11 (Al-Murrani et al. 2006; Al-Murrani, Al-Rawi, and Raof 2002; Al-Murrani et al. 1997; Campo and Davila 2002; Cheng et al. 2001; Harmon 1998; Huff et al. 2005; Mahboub, Muller, and von Borell 2004; Swaggerty et al. 2005) stärker ausgeprägt ist als bei 16-6.

Beim Fehlen entsprechender kreuzreagierender oder spezifischer Panleukozytenmarker besteht noch ein weiterer Ansatzpunkt um doch noch eine durchflusszytometrische Leukozytenzählung und partielle -differenzierung bei den relevanten Nutzgeflügel-species, Zier-, Zoo, und Greifvögeln zu ermöglichen: Der Einsatz eines speziesübergreifenden Thrombozytenmarkers in der Kombination mit membranaffinen Farbstoffen wie DiOC₅(3). Dabei sollte allerdings ein Durchflusszytometer zum Einsatz kommen, das auch Fluoreszenzen von Farbstoffen detektieren kann, bei denen die Interferenzen mit der DiOC₅(3)-Färbung geringer sind.

6.5 Anwendungsmöglichkeiten des neu entwickelten Verfahrens

Anwendungsmöglichkeiten für das neu entwickelte Verfahren bieten sich vor allem in der veterinärmedizinischen Diagnostik sowie der immunologischen und infektionsmedizinischen Forschung. Die Bestimmung des zahlenmäßigen Verhältnisses zwischen heterophilen Granulozyten und Lymphozyten wird üblicherweise zur Beurteilung der Stressbelastung bzw. -anfälligkeit von Geflügel genutzt. Durch die vereinfachte und gegenüber der Mikroskopie zuverlässigere Ermittlung dieses Wertes, bieten sich für die neue Technik auch Einsatzmöglichkeiten in der Tierzucht und im Tierschutz. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Möglichkeiten zur Anwendung des neu entwickelten Verfahrens erörtert und zugleich Vorschläge für experimentelle Studien gemacht, mit deren Hilfe weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Hühnerhämatologie gewonnen werden können.

6.5.1 Bestimmung von Referenzbereichen, Untersuchung von Modellen für hämatologische Veränderungen

Die große Schwankungsbreite der in der Literatur verzeichneten Referenzbereiche für die Gesamtleukozytenzahl und die einzelnen Leukozytenpopulationen bei verschiedenen Vogelspezies ist vermutlich vor allem darauf zurückzuführen, dass sie von verschiedenen Untersuchern, mit den unterschiedlichen fehleranfälligen manuellen Verfahren und zudem an kleinen Tierzahlen ermittelt wurden (El-Lethey, Huber-Eicher, and Jungi 2003). Durch die neue durchflusszytometrische Technik ist nun die Voraussetzung geschaffen, um mit einem genauen, standardisierbaren und automatisierten Verfahren eine große Anzahl von Proben zur Ermittlung verlässlicher Referenzbereiche zu untersuchen. Dafür sollten Hühner verschiedener Linien (Legerassen und Broiler), aller Altersklassen und beiderlei Geschlechts untersucht werden.

6.5.2 Beurteilung von Belastungssituationen und Stress mit Hilfe der Bestimmung des Heterophilen/Lymphozyten-Verhältnisses

Es ist davon auszugehen, dass die neue Technik durch eine genauere und zuverlässigere Bestimmung des Heterophilen/Lymphozyten-Verhältnisses eine bessere Beurteilung des auf Hühner einwirkenden Stresses zulassen wird. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für tierschutzrelevante Fragestellungen wie z.B. die Bewertung von unterschiedlichen Haltungssystemen, Lichtprogrammen, Tiertransporten oder der Eignung verschiedener Hühnerrassen für die Haltung in extremen Klimazonen (Latimer et al. 1988). Die Tierzucht könnte auch bei der Zucht leistungsfähigerer, langlebigerer und krankheitsresistenter Geflügellinien ebenso von der vereinfachten Bestimmung des H/L-Verhältnisses mit Hilfe des neuen Verfahrens profitieren (Puvadolpirod and Thaxton 2000; Davison and Flack 1981).

Weitere Anwendungen bieten sich beim Nachweis „streßresistenter“ und „stressempfindlicher“ Antigene an (Post, Rebel, and ter Huurne 2003; Newcomer 1958).

Dass experimentelle hämatologische Untersuchungen bei Hühnern trotz des Stresses bei der Blutentnahme aussagefähig sind, wird in der Literatur bestätigt (Huff et al. 2005). Die neue Technik erlaubt aufgrund ihrer Präzision aber genauere Untersuchungen zu den durch Stress bei der Blutentnahme bedingten hämatologischen Veränderungen. Hierfür könnten beispielsweise vergleichend an

Handling und Blutentnahme gewöhnte und nicht konditionierte Hühner untersucht werden. Auch der Einsatz von Venenverweilkathetern könnte bei der Beantwortung dieser Fragestellung weiterhelfen.

In experimentellen Studien könnte die Reproduktion von Stress durch Applikation von Hormonen wie ACTH (Berg 2002), Corticosteron (Fulton et al. 1996) oder Dexamethason (Anderson and Stephens 1970) erfolgen.

6.5.3 Beurteilung einer Immunsuppression

Für die Geflügel- und die Tiergesundheitsindustrie schafft das hier vorgestellte Verfahren weitere neue Möglichkeiten. So kommen beim Geflügel verschiedene immunsuppressive Viruskrankheiten vor, die enorme wirtschaftliche Schäden verursachen. Welche Bedeutung dem Komplex der immunsuppressiven Krankheiten beim Geflügel europaweit beigemessen wird, zeigt die durch die EU finanzierte COST Action 839 „Immunosuppressive Viral Diseases in Poultry“ (Pees and Christen 2004).

Im Rahmen der Prüfungen zur Sicherheit und Wirksamkeit von Lebend-Impfstoffen gegen solche Krankheiten besteht deshalb eine Nachfrage bezüglich der Erstellung weißer Blutbilder bei Hühnern. Schließlich fordert die EU-Richtlinie 2001/82/EG (Abschnitt C 5) für die Zulassungsverfahren von Tierimpfstoffen in den Mitgliedsstaaten: „Sofern das immunologische Tierarzneimittel negative Auswirkung auf die Immunreaktion des geimpften Tieres oder seiner Nachkommen haben könnte, sind angemessene Versuche über die immunologischen Funktionen durchzuführen“.

Zur Erarbeitung der Grundlagen sollten in Infektionsversuchen die Auswirkungen immunsuppressiver Viren wie z.B. der des Infektiösen Bursitis Virus und des Kükenanämievirus auf das Blutbild untersucht werden. In Vorversuchen könnte eine Immunsuppression mit entsprechenden Blutbildveränderungen experimentell durch Cyclophosphamid induziert werden (Latimer et al. 1988; Jortner and Adams 1971).

6.5.4 Gesundheitsmonitoring in Geflügelherden

Auch im Rahmen des intensiven Gesundheitsmonitorings das bei Großeltern- und Elterntierherden von Geflügelzuchtunternehmen durchgeführt wird, erscheint ein Einsatz des neuen Verfahrens denkbar. Aufgrund des hohen Wertes der Zuchtpopulationen könnten hier regelmäßige im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Herdenscreenings erfolgende Blutbildkontrollen frühzeitig als

Indikator für das Vorliegen subklinischer, mit den etablierten Testverfahren (insbesondere den direkten Erregernachweisen) nicht immer diagnostizierbarer, Infektionen dienen.

Um Interpretationsansätze für die Resultate von in der Routine durchgeführten hämatologischen Untersuchungen bieten zu können, sollten in experimentellen Studien mit Modellcharakter hämatologische Veränderungen induziert und mit dem neuen Verfahren erfasst werden (Ficken and Barnes 1990). Dafür könnten mit verschiedenen Pathogenen experimentell infizierte und aus landwirtschaftlichen Betrieben stammende „natürlich“ erkrankte Hühner, bei denen hämatologische Veränderungen zu erwarten sind, untersucht werden. Extreme Leukozytosen treten beispielsweise bekanntermaßen bei Aspergillose, Chlamydiose und Mycobacteriose auf (Natt 1959). Die Kinetik von Leukozytosen und Heterophilien lässt sich experimentell nach der Injektion von Terpentin in die Brustmuskulatur (Gross 1961) oder nach Auslösung von akuter Luftsackentzündung durch Phorbol-Myristatazetat untersuchen (Ferris and Bacha 1986). Als weitere Leukozytosemodelle könnten experimentelle Coccidiose (Anderson and Stephens 1970), *Escherichia coli* bedingte Luftsackentzündung (Schermer 1958; Wang et al. 2003; Harmon 1998) und Schistosomiasis (CLSI 2007; England, Rowan, and Standardization 1994; Westgard et al. 2003; McNaught and Wilkinson 1997) dienen. Heteropenien konnten bereits experimentell durch Salmonelleninfektionen provoziert werden (Hultin et al. 2007). Auch die posthämorrhagische Leukozytose und LPS-Injektionen können für Modelluntersuchungen genutzt werden (Brando et al. 2001).

6.6 Validierung und Qualitätssicherung des Verfahrens

Sollten im Rahmen der kommerziellen Nutzung der Technik weitere Untersuchungen zur Validierung der Technik gefordert werden, könnte man sich z.B. bei der Bestimmung von Wiederhol- und Vergleichspräzision an den in der Humanmedizin existierenden, detaillierten Empfehlungen für die Validierung von automatischen Hämatologie-Analysegeräten orientieren (Hattingh and Smith 1976). Derartig umfangreiche Experimente gehen jedoch oftmals weit über die in der tiermedizinischen Diagnostik üblichen Validierungsexperimente hinaus und können aufgrund des Fehlens der erforderlichen Referenzverfahren sicher nur in begrenztem Umfang realisiert werden.

Eine Überprüfung der Linearität der Methode könnte allerdings durch die Analyse von Verdünnungsreihen (Blut in Plasma) erfolgen. Dabei könnten zudem die

Grenzen des Meßbereichs bestimmt werden, in dem die Methode zuverlässige Ergebnisse liefert. Zur Qualitätssicherung und um die Vergleichbarkeit der in verschiedenen Laboren generierten Ergebnisse zu gewährleisten, könnten auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit verbindliche SOPs (Standard Operating Procedures) erarbeitet werden (Kolling, Hofmeier, and Merckenschlager 1992). Zur Optimierung der Ergebnisse sollte versucht werden, die vor der Messung durchgeführte Resuspension zur Trennung von Zell-Aggregaten zu standardisieren. Auch die Maßnahmen zur Begrenzung von carry over-Effekten (horizontale Verschleppung von Probenmaterial von einer Probe in die nächste) sollten in den SOPs erfasst sein. Zur Erzielung bester Ergebnisse muss in Betracht gezogen werden die Konjugate in einem zertifizierten kommerziellen Labor herstellen zu lassen, um eine optimale und gleichbleibende Qualität zu gewährleisten. Durch die Verwendung des BSA-haltigen Puffers werden Fehler durch den Verlust von beads über Aggregatbildung oder Adhärenz minimiert (Kolling, Hofmeier, and Merckenschlager 1992).

6.7 Erhöhung der EDTA-Konzentration bei der Ungerinnbarmachung von Blut legereifer Hennen

Zur Gewährleistung der Qualität der mit dem neuen Untersuchungsverfahren erzielten Ergebnisse ist auch erforderlich, dass die Blutproben über eine ausreichende Qualität verfügen. In diesem Zusammenhang sind die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Erfahrungen bei der Ungerinnbarmachung des Blutes von Legehennen mit EDTA zu beachten. Dass die Mehrzahl der mit 1,8 mg/ml EDTA versetzten, fixierten Blutproben von legereifen Hennen 72 Stunden nach der Entnahme geronnen war, vergleichbare Probleme nach der Erhöhung der EDTA-Konzentration auf 4,8 mg/ml aber nicht mehr auftraten, spricht dafür, dass zur Ungerinnbarmachung von Blutproben legereifer Hühner höhere EDTA-Konzentrationen erforderlich sind. In der Literatur wird lediglich für Taubenblut berichtet, dass eine vollständige Hemmung der Gerinnung erst bei EDTA-Konzentrationen zwischen 4 und 7 mg/ml erreicht wurde (Campbell 1995). Eine plausible Erklärung für die eigenen Beobachtungen bieten die hohen und während des Legezyklus schwankenden Spiegel an Gesamt-Kalzium im Blut von Legehennen. So wurde für weibliche Hühner mit Erreichen der Legereife ein Anstieg von 2,78 auf 5,78 mmol/l nachgewiesen. Dieser Wert ist etwa doppelt so hoch, wie die obere Grenze des Referenzbereichs für Menschen. Das ionisierte Kalzium stieg von 1,45

nur auf 1,59 mmol/l an. Damit liegt dieser Wert nur wenig über dem für die Humanmedizin angegebenen Referenzbereich. Da die Gerinnung der Legehennenblutproben durch EDTA-Konzentrationen von 1,8 mg/ml oftmals nur verzögert aber nicht verhindert wurde, kann angenommen werden, dass die in der Humanmedizin üblichen EDTA-Konzentrationen nicht ausreichen, um das nach und nach gemäß Massenwirkungsgesetz frei werdende ursprünglich proteingebundene Kalzium im Blut von Legehennen vollständig und dauerhaft zu binden. Dementsprechend sollten bei der hämatologischen Untersuchung von Legehennenblut deutlich höhere EDTA-Konzentrationen als die in der Humanmedizin gemäß den Empfehlungen der ICSH (International Council Society of Haematology) üblichen 1,8 mg/ml zum Einsatz kommen. Um bei Legehennenblut eine ausreichende K₂EDTA Konzentration zu erreichen, können für die Humanmedizin produzierte Entnahmeröhrchen verwendet werden, wenn sie lediglich mit ca. dem 0,25 - 0,45fachen des für die Humanmedizin empfohlenen Blutvolumens befüllt werden (z.B. 1,0 – 1,8 ml Blut anstatt 4ml).

6.8 Basophile und eosinophile Granulozyten

Bei der durchflusszytometrischen Analyse von Hühnerblutproben konnten zwei sehr kleine CD45⁺-Populationen dargestellt werden, die insgesamt erfahrungsgemäß zwischen 1% und 5% der Leukozyten ausmachten. Die größere der beiden Populationen konnte regelmäßig, die kleinere nur gelegentlich nachgewiesen werden. Beiden Populationen konnten zunächst keine konkreten Leukozytentypen zugeordnet werden. Hier halfen die Experimente zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Mikroskopie und Durchflusszytometrie weiter. Bei den unter 5.18 beschriebenen Untersuchungen war durchflusszytometrisch wieder nur die größere der beiden Populationen nachweisbar. Bei der Auswertung wurden die durchflusszytometrisch für die Population X ermittelten Werte mit den mikroskopisch bestimmten Zahlen der eosinophilen bzw. der basophilen Granulozyten in gruppierten Säulendiagrammen verglichen (Abb. 48, Abb. 49). Dabei zeigte sich, dass die niedrigen Eosinophilenzahlen nicht mit den für die Population X übereinstimmten. Die mikroskopisch ermittelten Basophilenzahlen hingegen zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Bis auf weiteres wurde die besagte Population in der vorliegenden Arbeit als basophile Granulozyten bezeichnet. Die abschließende Klärung des Sachverhalts sollte durch ein Zellseparierungsexperiment mit einem Sorter erfolgen.

Dabei könnten auch die anderen Populationen isoliert und mikroskopisch charakterisiert werden.

Für ein Huhn (Abb. 49, Tier Nr. 8) bestehen ungewöhnlich große Unterschiede zwischen den mit den verschiedenen Verfahren ermittelten Basophilenzahlen. Die Werte fallen als Ausreißer sowohl in den difference plots als auch in der Säulendiagrammdarstellung stark auf. Eine Überprüfung der Rohdaten mit Hilfe der graphischen Auswertung in FlowJo zeigte eine ungewöhnliche sonst niemals aufgetretene schlechte Trennung zwischen Erythrozyten und basophilen Granulozyten. Da dieser Effekt mit der Fixierung verschwand und kein zweites mal auftrat, scheint die Beobachtung keine Relevanz für die Praxis zu besitzen. Ohnehin besteht gegenwärtig noch kein großes Interesse an der Zählung von Basophilen in Hühnerblut. In noch größerem Maße gilt dies für die bisher durchflusszytometrisch nicht identifizierten eosinophilen Granulozyten. Schließlich existieren für diese beiden Zelltypen bisher nur sehr wenige Anhaltspunkte hinsichtlich der Interpretation ihrer Frequenz in Hühnerblutproben.

6.9 Ausblick

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit liefen bereits die ersten systematischen Untersuchungen mit Hilfe der neu entwickelten Technik. Im Rahmen von Arbeiten zur Verträglichkeit erhöhter Anteile von Ackerbohnen in der Diät von Legehennen wurden vom Institut für Tierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft die ersten fixierten Blutproben zur Analyse an das Institut für Tierphysiologie geschickt. Die Untersuchung der Blutproben und die Zellzahlermittlung mit Hilfe der unter 5.16.3 beschriebenen Gatingstrategie verliefen erfolgreich. Die Resultate werden voraussichtlich im Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen der betreffenden Studie in naher Zukunft publiziert. In Kürze beginnen die Untersuchungen im Zusammenhang mit anderen Projekten. Weitere Anfragen von wissenschaftlichen Kooperationspartnern aus den Bereichen Tierhaltung, Tierschutz, Tierzucht und Tiergesundheitsindustrie liegen vor.

Auch in Zukunft wird in der Vogelmedizin zwar nicht vollkommen auf die mikroskopische Untersuchung von Blutausstrichen verzichtet werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die hier beschriebene durchflusszytometrische Technik zur Bestimmung von Gesamtleukozytenzahl, Thrombozytenzahl und zur Leukozytendifferenzierung die derzeit eingesetzten mikroskopischen Verfahren sowie die bisher publizierten und aufgrund ihrer Unzuverlässigkeit nur selten angewandten

Diskussion

automatisierten Verfahren weitgehend ersetzt wird. Der Einschätzung von Campbell zu Folge, dürfte mit der hier vorgestellten Technik jedenfalls der Grundstein gelegt sein, der erforderlich war, um die Arbeiten in der Hühnerhämatologie zu beflügeln .

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines automatisierten durchflusszytometrischen Verfahrens zur Bestimmung von Gesamtleukozytenzahl und Thrombozytenzahl sowie zur Leukozytendifferenzierung beim Huhn. Damit schließt sie eine bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorhandene Lücke in der Vogelhämatologie.

In der Human- und Säugetiermedizin gehören die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl sowie die Erstellung des Differentialblutbilds zu den wichtigsten und am häufigsten durchgeführten labordiagnostischen Tests. Im Gegensatz dazu verhindern die hämatologischen Besonderheiten der Vögel, insbesondere die kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten, eine erfolgreiche Untersuchung von Vogelblut mit den gängigen Hämatologie-Analysegeräten. In Ermangelung eines geeigneten automatisierten Verfahrens zur entsprechenden Untersuchung von Vogelblut sahen sich Kliniker und Wissenschaftler hinsichtlich der Vogelhämatologie zum Einsatz unzuverlässiger sowie zeit- und arbeitsaufwändiger mikroskopischer Techniken gezwungen oder sie verzichteten gänzlich auf diese Untersuchungen.

Die hier dargestellte durchflusszytometrische Technik bietet für die Untersuchung von Hühnerblut einen neuen Ansatz. Sie basiert auf dem Einsatz verschiedener monoklonaler Antikörper, die gegen unterschiedliche Oberflächenantigene auf Blutzellen von Hühnern gerichtet sind. Durch die Kombination eines Thrombozytenmarkers (K1) mit einem Panleukozytenmarker (α CD45) gelingt die Identifizierung von Leukozyten und Thrombozyten. Die Differenzierung der verschiedenen Leukozytentypen wird zum Teil durch deren Unterschiede hinsichtlich Zellgröße und Granularität ermöglicht. Zum anderen finden bei dem Verfahren weitere monoklonale Antikörper Verwendung, die jeweils spezifisch an unterschiedliche Leukozytenfraktionen binden. Im Einzelnen sind dies der Monozytenmarker KUL01 und die Lymphozytenmarker α CD4, α CD8 α , BU1, und α TCR $\gamma\delta$. Durch die Kopplung der monoklonalen Antikörper an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können die verschiedenen Zellen anhand ihres Fluoreszenzverhaltens unter dem Laserlicht im Durchflusszytometer unterschieden werden. Die Zugabe einer definierten Anzahl von standardisierten, fluoreszierenden Partikeln und der Verzicht auf Waschschrte ermöglichen gleichzeitig die absolute Quantifizierung der Zellen. Somit lassen sich die Gesamtleukozyten- sowie die

Zusammenfassung

Thrombozytenzahl bestimmen. Auch für die einzelnen Leukozytenfraktionen können die absoluten Zellzahlen pro Blutvolumen ermittelt werden. In Verbindung mit einer hier vorgestellten Methode zur Fixierung von Vogelblut, erlaubt die Technik zudem den Versand und die anschließende zentrale Untersuchung der Blutproben. Das Verfahren ist einfach durchzuführen und zeichnet sich durch eine hohe Präzision aus. Aufgrund des hohen Automatisierungsgrades der Durchflusszytometrie ist die neue Technik zudem prädestiniert für die Untersuchung großer Probenzahlen. Anwendungsmöglichkeiten bieten sich vor allem in der veterinärmedizinischen Diagnostik, der immunologischen und infektionsmedizinischen Forschung, aber auch in der Tierzucht und im Tierschutz.

8 Summary

Development of a flow cytometry based procedure for the quantification of total leucocyte and thrombocyte numbers and leucocyte differential counts in whole blood samples from chickens

The present thesis describes the invention of a novel automated technique for flow cytometric total white blood cell and thrombocyte counts as well as white blood cell differentials in chicken. Thus, the technique closes an existing gap in avian haematology.

Total white blood cell counts and white blood cell differentials are among the most important and widely used diagnostic tools in human and mammalian medicine. By contrast haematological particularities in birds, especially the nucleated erythrocytes and thrombocytes avert the successful examination of avian blood samples by the use of current haematology analyzers. Due to the lack of an appropriate precise and automated technique suitable for the examination of chicken blood veterinarians and scientists have been restricted to time consuming, labour-intensive and vague microscopic techniques or they may have decided to set chicken haematology aside from their work and research.

The newly developed flow cytometric method offers a novel approach in chicken haematology. It is based upon the utilization of different monoclonal antibodies, directed against defined surface antigens on chicken blood cells. Through the combination of a thrombocyte marker (K1) and a pan leucocyte marker (CD45) these cell types can be precisely identified. The calculation of white blood cell differentials is made possible partially through differences in cell size and granularity and through the application of additional monoclonal antibodies detecting different leucocyte populations. Namely these are the monocyte marker KUL01 and the lymphocyte markers α CD4, α CD8 α , BU1, and α TCR $\gamma\delta$. By conjugation to different fluorochromes those antibodies facilitate cell discrimination because of their characteristic fluorescence patterns after laser light excitation in flow cytometry. The addition of a defined number of standardized, fluorescent beads and skipping of washing steps allow for absolute cell counting along with differentiation. Hence, total white blood cell and thrombocyte count are performed in a single step procedure. Absolute numbers of cells per μ l of blood can be calculated subsequently based on the accumulated

Summary

data. Additionally, chicken blood cells collected into EDTA can be stabilized for several days through the addition of Trans-Fix reagent without affecting the analytic procedure. This enables postage of routine blood samples and centralized laboratory analysis. The technique is easy to use and characterized by high precision. Application of flow cytometry leads to extensive automation which permits the processing of large numbers of samples. Veterinary diagnostics, research in immunology and infectious diseases, livestock breeding and animal welfare are possible fields of application.

9 Literaturverzeichnis

- Abbey, A. P., and R. R. Belliveau. 1978. Enumeration of platelets. *Am J Clin Pathol* 69 (1):55-6.
- Al-Murrani, W. K., A. J. Al-Rawi, M. F. Al-Hadithi, and B. Al-Tikriti. 2006. Association between heterophil/lymphocyte ratio, a marker of 'resistance' to stress, and some production and fitness traits in chickens. *Br Poult Sci* 47 (4):443-8.
- Al-Murrani, W. K., I. K. Al-Rawi, and N. M. Raof. 2002. Genetic resistance to *Salmonella typhimurium* in two lines of chickens selected as resistant and sensitive on the basis of heterophil/lymphocyte ratio. *Br Poult Sci* 43 (4):501-7.
- Al-Murrani, W. K., A. Kassab, H. Z. Al-Sam, and A. M. Al-Athari. 1997. Heterophil/lymphocyte ratio as a selection criterion for heat resistance in domestic fowls. *Br Poult Sci* 38 (2):159-63.
- Altman, D. G., and J. M. Bland. 1983. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician* 32:307-317.
- Altman, D. G., and J. M. Bland. 1987. Letter to the Editor. *Appl Stat* 36:224-225.
- Altman, Robert B. 1997. *Avian medicine and surgery*. Philadelphia ; London: Saunders.
- Alvarez-Larran, A., L. Jover, P. Marin, and J. Petriz. 2002. A multicolor, no-lyse no-wash assay for the absolute counting of CD34+ cells by flow cytometry. *Cytometry* 50 (5):249-53.
- Alvarez-Larran, A., T. Toll, S. Rives, and J. Estella. 2005. Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. *Clin Lab Haematol* 27 (1):41-6.
- Anderson, E. L., and J. F. Stephens. 1970. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. *Appl Microbiol* 19 (5):726-30.
- Andreasen, C. B., and K. S. Latimer. 1989. Separation of avian heterophils from blood using Ficoll-Hypaque discontinuous gradients. *Avian Dis* 33 (1):163-7.
- Andreasen, C. B., and K. S. Latimer. 1990. Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosinophils. *Vet Clin Pathol* 19 (2):51-54.

- Assendelft, O. W. van, F. E. Preston, and R. M. Rowan. 2001. *Advanced laboratory methods in haematology*. London: Arnold.
- Awadhiya, R. P., J. L. Vegad, and G. N. Kolte. 1980. Demonstration of the phagocytic activity of chicken thrombocytes using colloidal carbon. *Res Vet Sci* 29 (1):120-2.
- Baumel, Julian J. 1979. *Nomina anatomica avium : an annotated anatomical dictionary of birds*. London: Academic Press.
- Bayyari, G. R., W. E. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, L. A. Newberry, J. D. Villines, J. K. Skeeles, N. B. Anthony, and K. E. Nestor. 1997. Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses. *Poult Sci* 76 (2):289-96.
- Belamarich, F. A., D. Shepro, and M. Kien. 1968. ADP is not involved in thrombin-induced aggregation of thrombocytes of a non-mammalian vertebrate. *Nature* 220 (5166):509-10.
- Bell, D. J., and B. M. Freeman. 1971. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London (24 Oval Rd, N.W.1): Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Bell, D. J., and B. M. Freeman. 1971. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London (24 Oval Rd, N.W.1): Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Berg, T. van den. 2002. Immunosuppressive viral diseases in poultry : Proceedings and annual report ; Agriculture and biotechnology (Report-Nr.: EUR-20468).
- Bergeron, M., A. Shafaie, T. Ding, S. Phaneuf, N. Soucy, F. Mandy, J. Bradley, and J. Fahey. 2002. Evaluation of stabilized blood cell products as candidate preparations for quality assessment programs for CD4 T-cell counting. *Cytometry* 50 (2):86-91.
- Bland, J. M., and D. G. Altman. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1 (8476):307-10.
- Bland, J. M., and D. G. Altman. 1995. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 346 (8982):1085-7.
- Bland, J. M., and D. G. Altman. 1997. Difference versus mean plots. *Ann Clin Biochem* 34 (Pt 5):570-1.

- Bohls, R. L., R. Smith, P. J. Ferro, N. J. Silvy, Z. Li, and E. W. Collisson. 2006. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. *Dev Comp Immunol* 30 (9):843-50.
- Böttcher, W. 2006. *Eier Geflügel 2006, Deutschland, Europäische Union, Weltmarkt*. Bonn: ZMP zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH.
- Bounous, D.I., and N.L. Stedman. 2000. *Normal avian hematology: chicken and Turkey*. Edited by B. F. Feldman, J. G. Zinkl, N. C. Jain and O. W. Schalm. 5th ed. / editors Bernard F. Feldman, Joseph G. Zinkl, Nemi C. Jain. ed, *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia ; London: Lippincott Williams & Wilkins.
- Brando, B., W. Gohde, Jr., B. Scarpati, and G. D'Avanzo. 2001. The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. *Cytometry* 43 (2):154-60.
- Brooks RL Jr, Bounous DI, and Andreasen CB. 1996. Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comp Haematol Int* 6:153-159.
- Brown, S. A., and J. A. Barsanti. 1988. Quantitative buffy coat analysis for hematologic measurements of canine, feline, and equine blood samples and for detection of microfilaremia in dogs. *Am J Vet Res* 49 (3):321-4.
- Burgess, S. C., and T. F. Davison. 1999. Counting absolute numbers of specific leukocyte subpopulations in avian whole blood using a single-step flow cytometric technique: comparison of two inbred lines of chickens. *J Immunol Methods* 227 (1-2):169-76.
- Burton, R., and C. W. Guion. 1968. The differential leucocyte blood count: its precision and individuality in the chicken. *Poult Sci* 47 (6):1945-9.
- Burton, R. R., and J. S. Harrison. 1969. The relative differential leucocyte count of the newly hatched chick. *Poult Sci* 48 (2):451-3.
- Bush, M., and E.E. Smith. 1980. *Clinical chemistry and hematology as diagnostic aids in zoological medicine*. Edited by M. Montali, *Comparative pathology of zoo animals*: Smithsonian Inst Press.
- Buttarelo, M., M. Gadotti, C. Lorenz, E. Toffalori, N. Ceschini, A. Valentini, and P. Rizzotti. 1992. Evaluation of four automated hematology analyzers. A comparative study of differential counts (imprecision and inaccuracy). *Am J Clin Pathol* 97 (3):345-52.

Literaturverzeichnis

- Campbell, T. W. 1984. Diagnostic cytology in avian medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 14 (2):317-44.
- Campbell, T. W., and F. J. Dein. 1984. Avian hematology. The basics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 14 (2):223-48.
- Campbell, Terry W. 1995. *Avian hematology and cytology*. 2nd ed. ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Campbell, Terry W., and Christine D. V. M. Ellis. 2007. *Avian and exotic animal hematology and cytology*. 3rd ed. ed. Ames, Iowa ; Oxford: Blackwell.
- Campo, J. L., and S. G. Davila. 2002. Estimation of heritability for heterophil:lymphocyte ratio in chickens by restricted maximum likelihood. Effects of age, sex, and crossing. *Poult Sci* 81 (10):1448-53.
- Carlson, H. C., and J. R. Allen. 1969. The Acute Inflammatory Reaction in Chicken Skin: Blood Cellular Response. *Avian Dis* 13 (4):817-833.
- Carlson, H. C., and M. A. Hacking. 1972. Distribution of mast cells in chicken, turkey, pheasant, and quail, and their differentiation from basophils. *Avian Dis* 16 (3):574-7.
- Carlson, H. C., P. R. Sweeny, and J. M. Tokaryk. 1968. Demonstration of phagocytic and trephocytic activities of chicken thrombocytes by microscopy and vital staining techniques. *Avian Dis* 12 (4):700-15.
- Cassens, U., W. Gohde, G. Kuling, A. Groning, P. Schlenke, L. G. Lehman, Y. Traore, J. Servais, Y. Henin, D. Reichelt, and B. Greve. 2004. Simplified volumetric flow cytometry allows feasible and accurate determination of CD4 T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide. *Antivir Ther* 9 (3):395-405.
- Chan, M. M., C. L. Chen, L. L. Ager, and M. D. Cooper. 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J Immunol* 140 (7):2133-8.
- Chand, N., and P. Eyre. 1978. Rapid method for basophil count in domestic fowl. *Avian Dis* 22 (4):639-45.
- Chang, C. F., and P. B. Hamilton. 1979. The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. *J Reticuloendothel Soc* 25 (6):585-90.

Literaturverzeichnis

- Chapple, P., H. M. Prince, D. Wall, R. Filshie, D. Haylock, M. Quinn, M. Bretell, and D. Venter. 2000. Comparison of three methods of CD34+ cell enumeration in peripheral blood: dual-platform ISHAGE protocol versus single-platform, versus microvolume fluorimetry. *Cytotherapy* 2 (5):371-6.
- Chen, C. H., T. C. Chanh, and M. D. Cooper. 1984. Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal antibodies: ontogeny, tissue distribution and biochemical characterization. *Eur J Immunol* 14 (5):385-91.
- Chen, C. L., J. E. Lehmeyer, and M. D. Cooper. 1982. Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *J Immunol* 129 (6):2580-5.
- Cheng, H. W., S. D. Eicher, Y. Chen, P. Singleton, and W. M. Muir. 2001. Effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens. *Poult Sci* 80 (8):1079-86.
- Chung, K. S., H. S. Lillehoj, and M. C. Jenkins. 1991. Avian leucocyte common antigens: molecular weight determination and flow cytometric analysis using new monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 28 (3-4):259-73.
- CLSI. 2007. H20-A2. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods. *Approved Standard* Second Edition.
- Cohn, Z. A., and J. G. Hirsch. 1960. The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 112:983-1004.
- Coles, Embert H. 1986. *Veterinary clinical pathology*. 4th ed. ed. Philadelphia ; London: Saunders.
- Costello, R. T. 1970. A unopette for eosinophil counts. *Am J Clin Pathol* 54 (2):249-50.
- Davison, T. F., and I. H. Flack. 1981. Changes in the peripheral blood leucocyte populations following an injection of corticotrophin in the immature chicken. *Res Vet Sci* 30 (1):79-82.
- Dein, F. J. 1982. Avian clinical hematology. Paper read at Proc. Ann. Meet. Assoc. Avian Vet., 1982, at Atlanta, Georgia.
- Dein, F. J. 1984. *Laboratory manual of avian hematology*: East Northport, NY : Association of Avian Veterinarians.

- Dewitte, K., C. Fierens, D. Stockl, and L. M. Thienpont. 2002. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice. *Clin Chem* 48 (5):799-801; author reply 801-2.
- Dieterien-Lievre. 1988. *Vertebrate blood cells*. Edited by A. F. Rowley and N. A. Ratcliffe. Cambridge: Cambridge University Press.
- El-Lethey, H., B. Huber-Eicher, and T. W. Jungi. 2003. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. *Vet Immunol Immunopathol* 95 (3-4):91-101.
- England, J.M., R.M Rowan, and International Council for Standardization. 1994. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. International Council for Standardization in Haematology: prepared by the ICSH Expert Panel on Cytometry. Paper read at Clin Lab Haematol, Jun.
- Ettinger, Stephen J., and Edward C. Feldman. 2005. *Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat*. 6th ed. / Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman. ed. St. Louis, Miss. ; Oxford: Elsevier Saunders.
- Farnell, M. B., T. L. Crippen, H. He, C. L. Swaggerty, and M. H. Kogut. 2003. Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial toll agonists. *Dev Comp Immunol* 27 (5):423-9.
- Feldman, Bernard F., Joseph G. Zinkl, Nemi C. Jain, and O. W. Schalm's veterinary hematology Schalm. 2000. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. / editors Bernard F. Feldman, Joseph G. Zinkl, Nemi C. Jain. ed. Philadelphia ; London: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ferris, M., and W. J. Bacha, Jr. 1986. Response of leukocytes in chickens infected with the avian schistosome *Austrobilharzia variglandis* (Trematoda). *Avian Dis* 30 (4):683-6.
- Ficken, M. D., and H. J. Barnes. 1990. Acute airsacculitis in turkeys inoculated with phorbol myristate acetate. *Am J Vet Res* 51 (6):958-62.
- Fischer, A., J. Lechner, W. Kraft, and J. Hirschberger. 1989. Test eines zentrifugalen Hämatologiesystems für die Praxis. *Tierärztl. Prax.* 17:227-230.
- Flammer, K. 1989. Basic laboratory diagnostic techniques in avian practice: microbiology, hematology and clinical chemistries. Paper read at Ann. Meet. Ass. Avian Vet., at Boulder/Colorado.

- Flammer, K. 1989. Venepuncture for collection of Blood Samples. *JAAV* (3):79.
- Fonio, A. 1912. Über ein neues Verfahren der Blutplättchenzählung. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie* 117:176-194.
- Fornas, O., J. Garcia, and J. Petriz. 2000. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med* 6 (7):833-6.
- Fowler, Murray E., and R. Eric Miller. 2003. *Zoo and wild animal medicine*. 5th ed. ed. Philadelphia, Pa ; [London]: W. B. Saunders.
- Fox, A. J., and J. B. Solomon. 1980. Avian Immunology ; proceedings of the 16th Poultry Science Symposium, at Edinburgh.
- Fredlin, P. J. 1985. Destructive Effect of Heparin on avian erythrocytes. *Avian Pathol.* 14:531.
- Fudge, A. M. 1989. Avian hematology identification and interpretation. Paper read at Ann. Conf. Ass. Avian Vet., at California.
- Fudge, A. M. 1994. Blood testing artifacts: Interpretation and prevention. *Semin. Avian Exotic Pet Med* 3:2-4.
- Fudge, A. M. . 1995. Clinical application of laser flow cytometry to avian haematology analysis. Paper read at Proc Assoc Avian Vet.
- Fudge, Alan M. 2000. *Laboratory medicine : avian and exotic pets*. Philadelphia ; London: Saunders.
- Fulton, R.M, W.M. Reed, H.L. Thacker, and D.B. DeNicola. 1996. Cyclophosphamide (Cytoxan)-induced Hematologic Alterations in Specific-pathogen-free Chickens. *Avian Diseases* 40:1-12.
- Gering, E., and C. T. Atkinson. 2004. A rapid method for counting nucleated erythrocytes on stained blood smears by digital image analysis. *J Parasitol* 90 (4):879-81.
- Glaenz, Wiltrud. 1933. Ueber die technik der Entnahme größerer Blutmengen von lebenden Vögeln vermittels der Herzpunktion. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*. 130 (I. Orig.):462.

- Glencross, D. K., G. Janossy, L. M. Coetzee, D. Lawrie, H. M. Aggett, L. E. Scott, I. Sanne, J. A. McIntyre, and W. Stevens. 2008. Large-scale affordable PanLeucogated CD4+ testing with proactive internal and external quality assessment: in support of the South African national comprehensive care, treatment and management programme for HIV and AIDS. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1:S40-51.
- Glencross, D., L. E. Scott, I. V. Jani, D. Barnett, and G. Janossy. 2002. CD45-assisted PanLeucogating for accurate, cost-effective dual-platform CD4+ T-cell enumeration. *Cytometry* 50 (2):69-77.
- Glick, B., K. Sato, and F. Cohenour. 1964. Comparison of the Phagocytic Ability of Normal and Bursectomized Birds. *J Reticuloendothel Soc* 15:442-9.
- Gobel, T. W., C. H. Chen, and M. D. Cooper. 1996. Expression of an avian CD6 candidate is restricted to alpha beta T cells, splenic CD8+ gamma delta T cells and embryonic natural killer cells. *Eur J Immunol* 26 (8):1743-7.
- Gobel, T. W., C. L. Chen, J. Shrimpf, C. E. Grossi, A. Bernot, R. P. Bucy, C. Auffray, and M. D. Cooper. 1994. Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. *Eur J Immunol* 24 (7):1685-91.
- Gobel, T. W., B. Kaspers, and M. Stangassinger. 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 13 (6):757-62.
- Goossens, W., L. Van Hove, and R. L. Verwilghen. 1991. Monocyte counting: discrepancies in results obtained with different automated instruments. *J Clin Pathol* 44 (3):224-7.
- Graham, D.L. 1987. Preparing hematology specimens. *AAV Today* 1:122-123.
- Grimaldi, E., P. Carandente, F. Scopacasa, M. F. Romano, M. Pellegrino, R. Bisogni, and M. De Caterina. 2005. Evaluation of the monocyte counting by two automated haematology analysers compared with flow cytometry. *Clin Lab Haematol* 27 (2):91-7.
- Gross, H. J. 1984. Differential and Total Avian Blood Cell Counts by the Hemacytometer Method. *Avian/Exotic Practice* 1 (2):31-36.
- Gross, W. B. 1961. Blood cultures, blood counts and temperature records in an experimentally produced "air sac disease" and uncomplicated *Escherichia coli* infections of chickens. *Poult Sci* 41:691-709.

- Gross, W. B. 1983. Heterophil/lymphocyte relationship to stress. *Am Assoc. Vet. Newsl.* (4):25.
- Gross, W. B. 1989. Factors affecting chicken thrombocyte morphology and the relationship with heterophil:lymphocyte ratios. *Br Poult Sci* 30 (4):919-25.
- Gylstorff-Sassenhoff, Irmgard, and Fritz Grimm. 1998. *Vogelkrankheiten*. 2., völlig überarb. Aufl. ed. Stuttgart: Ulmer.
- Hanusova, D., and V. J. Pujman. 1970. Remarks of the hemogram of the pheasants. *Folia haematologica* 93:266-272.
- Harmon, B. G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci* 77 (7):972-7.
- Harrison, Greg J., and Linda R. Harrison. 1986. *Clinical avian medicine and surgery : including aviculture*. Philadelphia ; London: Saunders.
- Harrison, Greg J., and Teresa L. Lightfoot. 2006. *Clinical avian medicine*. Palm Beach, FL: Spix Pub.
- Hattingh, J., and E. M. Smith. 1976. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflugers Arch* 363 (3):267-9.
- Hauska, H., A. Scope, L. Vasicek, and B. Reauz. 1999. Vergleichende Untersuchungen zur Färbung aviärer Blutzellen. *Tierärztl. Prax* 27:280-287.
- Hawkey, Christine M., and T. B. Dennett. 1990. *Farbatlas der Hämatologie Säugetiere, Vögel und Reptilien*. Hannover: Schlüter.
- He, H., K. J. Genovese, D. J. Nisbet, and M. H. Kogut. 2006. Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes. *Mol Immunol* 43 (7):783-9.
- Hoffman, R. A., P. C. Kung, W. P. Hansen, and G. Goldstein. 1980. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (8):4914-7.
- Horton, M. A., D. Lewis, K. McNulty, J. A. Pringle, and T. J. Chambers. 1985. Monoclonal antibodies to osteoclastomas (giant cell bone tumors): definition of osteoclast-specific cellular antigens. *Cancer Res* 45 (11 Pt 2):5663-9.

Houwen, B. . 2001. The Differential Cell Count. *Lab. Hematol.* 7 (2):89–100.

<http://www.cf.ac.uk>.

/medic/aboutus/departments/haematology/cytometry/countingstatistics/index.html.

<http://www.fao.org>. /DOCREP/005/AC802E/ac802e0a.htm#TopOfPage.

<http://www.vetmed.wsu.edu>. /tkp/CDARect.aspx?ID=206&ID2=14.

Hubl, W., S. Andert, A. Erath, A. Lapin, and P. M. Bayer. 1995. Peripheral blood monocyte counting: towards a new reference method. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33 (11):839-45.

Hubl, W., S. Hauptlorenz, L. Tlustos, R. Jilch, M. Fischer, and P. M. Bayer. 1995. Precision and accuracy of monocyte counting. Comparison of two hematology analyzers, the manual differential and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 103 (2):167-70.

Hubl, W., L. Tlustos, A. Erath, S. Andert, and P. M. Bayer. 1996. Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labelled monoclonal antibodies. *Cytometry* 26 (1):69-74.

Hubl, W., G. Wolfbauer, S. Andert, G. Thum, J. Streicher, C. Hubner, A. Lapin, and P. M. Bayer. 1997. Toward a new reference method for the leukocyte five-part differential. *Cytometry* 30 (2):72-84.

Huff, G. R., W. E. Huff, J. M. Balog, N. C. Rath, N. B. Anthony, and K. E. Nestor. 2005. Stress response differences and disease susceptibility reflected by heterophil to lymphocyte ratio in turkeys selected for increased body weight. *Poult Sci* 84 (5):709-17.

Hultin, L. E., F. A. Menendez, P. M. Hultin, B. D. Jamieson, M. R. O'Gorman, L. Borowski, J. L. Matud, T. N. Denny, and J. B. Margolick. 2007. Assessing immunophenotyping performance: proficiency-validation for adopting improved flow cytometry methods. *Cytometry B Clin Cytom* 72 (4):249-55.

Hutt, F. B. 1933. Research with a Hen. *Science* 78 (2029):449-452.

- ICSH. 1993. Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulation of Blood for Blood Cell Counting and Sizing. International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry. Paper read at Am J Clin Pathol, Oct.
- Inoue, T., T. Moritomo, Y. Tamura, S. Mamiya, H. Fujino, and T. Nakanishi. 2002. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish Shellfish Immunol* 13 (5):379-90.
- Ito, N. M., and G. M. Bohm. 1986. Turpentine-induced acute inflammatory response in Gallus gallus: oedema, vascular permeability and effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Res Vet Sci* 41 (2):231-6.
- Jacobson, Elliott R. Ed, and George V. Ed Kollias. 1988. *Exotic animals*: Churchill Livingstone.
- Jain, Nemi C. 1993. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jani, V., G. Janossy, A. Iqbal, F. S. Mhalu, E. F. Lyamuya, G. Biberfeld, D. K. Glencross, L. Scott, J. T. Reilly, V. Granger, and D. Barnett. 2001. Affordable CD4+ T cell counts by flow cytometry. II. The use of fixed whole blood in resource-poor settings. *J Immunol Methods* 257 (1-2):145-54.
- Janossy, G., I. V. Jani, N. J. Bradley, A. Bikoue, T. Pitfield, and D. K. Glencross. 2002. Affordable CD4(+)-T-cell counting by flow cytometry: CD45 gating for volumetric analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (5):1085-94.
- Janossy, G., I. V. Jani, M. Kahan, D. Barnett, F. Mandy, and H. Shapiro. 2002. Precise CD4 T-cell counting using red diode laser excitation: for richer, for poorer. *Cytometry* 50 (2):78-85.
- Jensen, A. L., and M. Bantz. 1993. Comparing laboratory tests using the difference plot method. *Vet Clin Pathol* 22 (2):46-48.
- Jortner, B. S., and W. R. Adams. 1971. Turpentine-induced inflammation in the chicken. A light- and electron- microscope study, with emphasis on the macrophage, epithelioid cell, and multinucleated giant cell reaction. *Avian Dis* 15 (3):533-50.
- Joseph, V., D. Wagner, J. Stouli, and Palagi L.. 1989. Toluidine blue stain for avian WBC count. *J. Assoc. Avian Vet* (3):191-229.

- Kaiser, P., L. Rothwell, E. E. Galyov, P. A. Barrow, J. Burnside, and P. Wigley. 2000. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology* 146 Pt 12:3217-26.
- Kaspers, B., H. S. Lillehoj, and E. P. Lillehoj. 1993. Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 36 (4):333-46.
- Kass, L., G. J. Harrison, and C. Lindheimer. 2002. A new stain for identification of avian leukocytes. *Biotech Histochem* 77 (4):201-6.
- Katiyar, A. K., J. L. Vegad, and R. P. Awadhiya. 1992. Pathology of inflammatory-reparative response in punched wounds of the chicken skin. *Avian Pathol.* 21 (3):471-480.
- Klieneberger, Carl. 1927. <<Die>> *Blutmorphologie der Laboratoriumstiere Neue morphologische und anatomische Untersuchungen und Anhangs-Untersuchungen normaler Physiologie*. 2. Aufl. ed. Leipzig: Barth.
- Koepke, J. A. 1980. Standardisation of the manual leukocyte count. *Lab Med* 11:371-375.
- Koepke, J. A. 1977. *Differential Leukocyte Counting : Conference : Papers*.
- Kogut, M. H., K. J. Genovese, and V. K. Lowry. 2001. Differential activation of signal transduction pathways mediating phagocytosis, oxidative burst, and degranulation by chicken heterophils in response to stimulation with opsonized *Salmonella enteritidis*. *Inflammation* 25 (1):7-15.
- Kogut, M. H., K. J. Genovese, and D. J. Nisbet. 2001. Signal transduction pathways activated by engaging immunoglobulin Fc receptors on chicken heterophils. *Dev Comp Immunol* 25 (7):639-46.
- Kogut, M. H., C. Holtzapple, V. K. Lowry, K. Genovese, and L. H. Stanker. 1998. Functional responses of neonatal chicken and turkey heterophils following stimulation by inflammatory agonists. *Am J Vet Res* 59 (11):1404-8.
- Kogut, M. H., M. Iqbal, H. He, V. Philbin, P. Kaiser, and A. Smith. 2005. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Dev Comp Immunol* 29 (9):791-807.

- Kogut, M. H., E. D. McGruder, B. M. Hargis, D. E. Corrier, and J. R. DeLoach. 1995. In vivo activation of heterophil function in chickens following injection with *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. *J Leukoc Biol* 57 (1):56-62.
- Kogut, M. H., L. Rothwell, and P. Kaiser. 2003. Differential regulation of cytokine gene expression by avian heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enteritidis*. *J Interferon Cytokine Res* 23 (6):319-27.
- Kogut, M., V. K. Lowry, and M. Farnell. 2002. Selective pharmacological inhibitors reveal the role of Syk tyrosine kinase, phospholipase C, phosphatidylinositol-3'-kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase in Fc receptor-mediated signaling of chicken heterophil degranulation. *Int Immunopharmacol* 2 (7):963-73.
- Kolb, K. H. . 1958. Ein Beitrag zur Blutmorphologie der Greifvögel (Raptore). *Die Kleintierpraxis* 3:111-112.
- Kolling, K., A. Hofmeier, and M. Merckenschlager. 1992. [The ionized calcium in the blood of domestic chickens: dependence on the laying cycle]. *Zentralbl Veterinarmed A* 39 (2):115-20.
- König, Horst Erich, and H. Bragulla. 2001. *Anatomie und Propädeutik des Geflügels Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Stuttgart: Schattauer.
- Korbel, R. 1990. [The practice of injection and blood collection techniques in bird patients]. *Tierarztl Prax* 18 (6):601-11.
- Korbel, R. 2001. *Anatomie und Propädeutik des Geflügels Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Edited by H. E. König and H. Bragulla. Stuttgart: Schattauer.
- Kothlow, S., N. K. Mannes, B. Schaerer, D. E. Rebeski, B. Kaspers, and U. Schultz. 2005. Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol* 29 (8):733-48.
- Kothlow, S., I. Morgenroth, Y. Graef, K. Schneider, I. Riehl, P. Staeheli, P. Schneider, and B. Kaspers. 2007. Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken. *Int Immunol* 19 (2):203-15.
- Kothlow, S., I. Morgenroth, C. A. Tregaskes, B. Kaspers, and J. R. Young. 2008. CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture. *Dev Comp Immunol* 32 (9):1015-26.

Kozma, J. . 1930. Differential-Färbung der Blutzellen bei Vögeln. *D. T. W.* 38:281.

Kraft, Helmut, and Dieter Schillinger. 1989. *Klinische Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haussäugetieren*. 3., neu bearb. und erg. Aufl. ed. Stuttgart: Enke.

Kyes, P. 1929. Normal leukocyte content of bird's blood. *Anat. Rec.* 43:197-198.

Lacoste-Eleaume, A. S., C. Bleux, P. Quere, F. Coudert, C. Corbel, and C. Kanellopoulos-Langevin. 1994. Biochemical and functional characterization of an avian homolog of the integrin GPIIb-IIIa present on chicken thrombocytes. *Exp Cell Res* 213 (1):198-209.

Lane, R. 1991. Basic techniques in pet avian clinical pathology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21 (6):1157-79.

Lape'-Nixon, M. L., and H. E. Prince. 1996. How many gated lymphocytes are needed for accurate assessment of T-subset percentages by flow cytometry? *Cytometry* 26 (3):223-6.

Latimer, K. S., I. M. Kircher, and C. B. Andreasen. 1989. Separation of turkey heterophils from blood using two-step Ficoll-Hypaque discontinuous gradients. *Avian Dis* 33 (3):571-3.

Latimer, K. S., and P. M. Rakich. 1989. Clinical interpretation of leukocyte responses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 19 (4):637-68.

Latimer, K. S., K. N. Tang, M. A. Goodwin, W. L. Steffens, and J. Brown. 1988. Leukocyte changes associated with acute inflammation in chickens. *Avian Dis* 32 (4):760-72.

Leutz, A., H. Beug, and T. Graf. 1984. Purification and characterization of cMGF, a novel chicken myelomonocytic growth factor. *Embo J* 3 (13):3191-7.

Leutz, A., K. Damm, E. Sterneck, E. Kowenz, S. Ness, R. Frank, H. Gausepohl, Y. C. Pan, J. Smart, M. Hayman, and et al. 1989. Molecular cloning of the chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) reveals relationship to interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor. *Embo J* 8 (1):175-81.

Levine, R. A., A. H. Hart, and S. C. Wardlaw. 1986. Quantitative buffy coat analysis of blood collected from dogs, cats, and horses. *J Am Vet Med Assoc* 189 (6):670-3.

- Li, Z., K. E. Nestor, Y. M. Saif, Z. Fan, M. Luhtala, and O. Vainio. 1999. Cross-reactive anti-chicken CD4 and CD8 monoclonal antibodies suggest polymorphism of the turkey CD8alpha molecule. *Poult Sci* 78 (11):1526-31.
- Lilliehook, I., H. Wall, R. Tauson, and H. Tvedten. 2004. Differential leukocyte counts determined in chicken blood using the Cell-Dyn 3500. *Vet Clin Pathol* 33 (3):133-8.
- Lucas, A. M. 1959. A discussion of synonymy in avian and mammalian hematological nomenclature. *Am J Vet Res* 20:887-97.
- Lucas, Alfred M. and Jamroz, and Casimir Jamroz. 1961. *Atlas of Avian Hematology*, [Agriculture Monograph. no. 25.]: pp. vi. 271. Washington.
- Luhtala, M. 1998. Chicken CD4, CD8alphabeta, and CD8alphaalpha T cell co-receptor molecules. *Poult Sci* 77 (12):1858-73.
- Luhtala, M., O. Lassila, P. Toivanen, and O. Vainio. 1997. A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 27 (1):189-93.
- Luhtala, M., J. Salomonsen, Y. Hirota, T. Onodera, P. Toivanen, and O. Vainio. 1993. Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma* 12 (6):633-46.
- MacGregor, R.G.S. 1949. The Differential leukocyte Count. *J Pathol Bacteriol* 51:337.
- Macrae, E. K., and J. K. Spitznagel. 1975. Ultrastructural localization of cationic proteins in cytoplasmic granules of chicken and rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Sci* 17 (1):79-94.
- Magath, T. B., and G. M. Higgins. 1934. the blood of the normal duck. *Fol. Hem.* 51:230-241.
- Mahboub, H. D., J. Muller, and E. von Borell. 2004. Outdoor use, tonic immobility, heterophil/lymphocyte ratio and feather condition in free-range laying hens of different genotype. *Br Poult Sci* 45 (6):738-44.
- Mandy, F. F., J. K. Nicholson, and J. S. McDougal. 2003. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 52 (RR-2):1-13.

- Maxwell, M. H. 1980. Attempted induction of an avian eosinophilia using various agents. *Res Vet Sci* 29 (3):293-7.
- Maxwell, M. H. 1984. Histochemical identification of tissue eosinophils in the inflammatory response of the fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 37 (1):7-11.
- Maxwell M. H., and Robertson G. W. 1995. The avian basophilic leukocyte A review. *World Poult Sci J* 51:307-325.
- Maxwell, M. H., and R. B. Burns. 1986. Experimental stimulation of eosinophil production in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Res Vet Sci* 41 (1):114-23.
- Maxwell, M. H., G. W. Robertson, I. A. Anderson, L. A. Dick, and M. Lynch. 1991. Haematology and histopathology of seven-week-old broilers after early food restriction. *Res Vet Sci* 50 (3):290-7.
- Maxwell, M. H., G. W. Robertson, S. Spence, and C. C. McCorquodale. 1990. Comparison of haematological values in restricted- and ad libitum-fed domestic fowls: white blood cells and thrombocytes. *Br Poult Sci* 31 (2):399-405.
- Maxwell, M. H., and F. Trejo. 1970. The ultrastructure of white blood cells and thrombocytes of the domestic fowl. *Br Vet J* 126 (11):583-92.
- Mc Entee, L. 1984. Avian Clinical Hematology from the Laboratory Perspective. Paper read at Int. Conf. Avian Med., 1984, at Toronto.
- McNaught, Alan D., and Andrew Wilkinson. 1997. *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations*. 2nd ed / compiled by Alan D. McNaught and Andrew Wilkinson. ed. Oxford: Blackwell Science.
- Mehner, Alfred, and Wilhelm Hartfiel. 1983. *Handbuch der Geflügelphysiologie*. Jena: Fischer.
- Meyer, Dennis J., and John W. Harvey. 2004. *Veterinary laboratory medicine : interpretation & diagnosis*. 3rd ed. ed. Philadelphia, Pa. ; [London]: Saunders.
- Mironova, L. 2004. Modifizierte durchflusszytometrische Methode zum empfindlichen Nachweis der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten in vitro., Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

- Mischke, Reinhard. 2003. *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. Hannover: Schlütersche.
- Montali, R. J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol* 99 (1):1-26.
- Morgenroth, I. 2007. Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion des Haushuhns, *Diss, Vet.Med. LMU München*.
- Moritomo, T., A. Minami, Y. Inoue, and T. Nakanishi. 2002. A new method for counting of quail leukocytes by flow cytometry. *J Vet Med Sci* 64 (12):1149-51.
- Moritz, A. 2000. Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. *Habil.-Schrift, Giessen*.
- Moritz, A., Y. Fickenscher, K. Meyer, K. Failing, and D. J. Weiss. 2004. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol* 33 (1):32-8.
- Mukkur, T. K., and R. E. Bradley. 1967. Differentiation of avian thrombocytes from leukocytes by use of Giemsa's stain. *Poult Sci* 46 (6):1595-6.
- Natt, M. P. 1959. The effect of caecal coccidiosis on the blood cells of the domestic fowl. 3. The changes in the leukocyte picture during the course of the infection. *Exp. Parasitol.* 8:182-187.
- Natt, M. P., and C. A. Herrick. 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science* 31:735-738.
- Neuerer, F.F. 2005. Evaluation des vollautomatischen Hämatologiegerätes CELL-DYN 3500 im klinischen Einsatz bei Hund und Katze. *Diss, Vet.Med. LMU München*.
- Newcomer, W. S. 1958. Physiologic factors which influence acidophilia induced by stressors in the chicken. *Am J Physiol* 194 (2):251-4.
- Nguyen, Doyen T., Lawrence W. Diamond, and Raul C. Braylan. 2003. *Flow cytometry in hematopathology : a visual approach to data analysis and interpretation*. Totowa, N.J. ; [Great Britain]: Humana Press.

- Nicholson, J., P. Kidd, F. Mandy, D. Livnat, and J. Kagan. 1996. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 26 (3):227-30.
- Nirmalan, G. P., and G. A. Robinson. 1971. Haematology of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Br Poult Sci* 12 (4):475-81.
- Nourbakhsh, M., J. G. Atwood, J. Raccio, and D. Seligson. 1978. An evaluation of blood smears made by a new method using a spinner and diluted blood. *Am J Clin Pathol* 70 (6):885-92.
- Paramithiotis, E., L. Tkalec, and M. J. Ratcliffe. 1991. High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes. *J Immunol* 147 (11):3710-7.
- Pees, Michael, and Cornelia Christen. 2004. *Leitsymptome bei Papageien und Sittichen diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Stuttgart: Enke.
- Pendl, H. 2005. Avian and Reptilian Hematology. Paper read at 8th European AAV Conference (Association of Avian Veterinarians / 6th Scientific ECAMS Meeting (European College of Avian Medicine and Surgery, at Arles, Provence, France.
- Petersen, P. H., D. Stockl, O. Blaabjerg, B. Pedersen, E. Birkemose, L. Thienpont, J. F. Lassen, and J. Kjeldsen. 1997. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with reference method by use of difference plots. *Clin Chem* 43 (11):2039-46.
- Pierre, R. V. 2002. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 22 (1):279-97.
- Plonait, Hans. 1980. *Labordiagnostik für die tierärztliche Praxis*. Berlin <etc.>: Parey.
- Post, J., J. M. Rebel, and A. A. ter Huurne. 2003. Automated blood cell count: a sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. *Poult Sci* 82 (4):591-5.
- Pschyrembel, Willibald, Otto Dornblüth, and Christoph Zink. 1990. *Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica*. 256., neu bearb. Aufl. ed. Berlin: de Gruyter.

- Püsch, M. 2002. Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaption und Evaluation bei den Tierarten Schaf und Ziege. *Diss, Vet.Med. Justus -Liebieg-Univ. Gießen*.
- Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poult Sci* 79 (3):363-9.
- Radbruch, A. 2007. *Flow cytometry and cell sorting*. 2nd ed. ed. Berlin ; London: Springer.
- Reauz, B. , A. Scope, H. Hauska, and L. Vasicek. 1999. Vergleich hämatologischer Untersuchungsmethoden bei Vögeln. *Tierärztl Prax* 27 (K):65-70.
- Reauz, E. 1996. Vergleich hämatologischer Untersuchungsmethoden bei Vögeln., *Diss, Vet.Med. Univ. Wien*
- Ritchie, Branson W., Greg J. Harrison, and Linda R. Harrison. 1994. *Avian medicine : principles and application*. Lake Worth, Fla.: Wingers Pub.
- Robertson, G. W., and M. H. Maxwell. 1990. Modified staining techniques for avian blood cells. *Br Poult Sci* 31 (4):881-6.
- Robertson, G. W., and M. H. Maxwell. 1993. Importance of optimal mixtures of EDTA anticoagulant: blood for the preparation of well-stained avian blood smears. *Br Poult Sci* 34 (3):615-7.
- Rodnan, G. P., F. G. Ebaugh, Jr., and M. R. Fox. 1957. The life span of the red blood cell and the red blood cell volume in the chicken, pigeon and duck as estimated by the use of Na₂Cr⁵¹O₄, with observations on red cell turnover rate in the mammal, bird and reptile. *Blood* 12 (4):355-66.
- Rogers, S. L., T. W. Gobel, B. C. Viertelboeck, S. Milne, S. Beck, and J. Kaufman. 2005. Characterization of the chicken C-type lectin-like receptors B-NK and B-lec suggests that the NK complex and the MHC share a common ancestral region. *J Immunol* 174 (6):3475-83.
- Roleff, S. 2004. Klinische Evaluierung des automatischen Blutzellzählgerätes CA530-VET durch Vergleich mit dem CELL-DYN 3500 und Standardmethoden für die Tierarten Hund, Katze und Pferd. *Diss, FU Berlin*.
- Rowley, A. F., and N. A. Ratcliffe. 1988. *Vertebrate blood cells*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Rümke, C.L. 1977. *The statistically Expected Variability in Differential Leukocyte Counting*. Edited by J. A. Koepke, *Differential Leukocyte Counting : Conference : Papers*.
- Russo, E. A., L. McEntee, L. Applegate, and J. S. Baker. 1986. Comparison of two methods for determination of white blood cell counts in macaws. *J Am Vet Med Assoc* 189 (9):1013-6.
- Sack, U., A. Tarnok, and G. Rothe. 2006. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*.
- Santos, M. D., M. Yasuike, I. Hirono, and T. Aoki. 2006. The granulocyte colony-stimulating factors (CSF3s) of fish and chicken. *Immunogenetics* 58 (5-6):422-32.
- Schalm, O. W., N. C. Jain, and E. J. Carroll. 1975. *Veterinary Haematology*. 3rd ed. ed. [S.I.]: Lea and Febiger.
- Schalm, O. W., and Nemi C. Jain. 1986. *Schalm's veterinary hematology*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Schermer, Siegmund. 1958. <<Die>> *Blutmorphologie der Laboratoriumstiere*. 2. Aufl. ed. Leipzig: J. A. Barth Verl.
- Scheunert, Arthur, Alfred Trautmann, and Günter Wittke. 1987. *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*. 7., völlig Neubearb. Aufl. ed. Berlin <etc.>: Parey.
- Seidl, E. . 2003. Evaluierung des QBC-Vet Autoread Systems für die Zählung aviärer Blutzellen, Diss, Vet.Med., Univ. Wien.
- Shapiro, Howard M. 2003. *Practical flow cytometry*. 4th ed. ed. New York ; [Great Britain]: Wiley-Liss.
- Shaw, A. E. 1930. A direct method for counting the leukocytes, thrombocytes, and erythrocytes of bird blood. *J. Pathol Bacteriol* 32:833 - 835.
- Shaw, A. F. B. 1933. The leukocytes of the pigeon with special reference to diurnal rhythm. *J. Pathol. Bact.* 37:411-420.
- Shen, P. F., and L. T. Patterson. 1983. A simplified Wright's stain technique for routine avian blood smear staining. *Poult. Sci* 62:923.

- Sherman, G. G., J. S. Galpin, J. M. Patel, B. V. Mendelow, and D. K. Glencross. 1999. CD4+ T cell enumeration in HIV infection with limited resources. *J Immunol Methods* 222 (1-2):209-17.
- Smith, F.M., N.H. West, and D.R. Jones. 2000. *The cardiovascular system*. 5th ed, *Sturkie's avian physiology*. San Diego: Academic Press.
- Steel, E. G., H. D. Petersen, A. Blanks, and H. E. Smalley. 1977. The application of an electronic particle counter with a mean cell volume computer and an hematocrit accessory to avian hematology. *Poult Sci* 56 (3):839-42.
- Stiene-Martin, E.A. 1980. Causes for poor leukocyte distribution in manual spreader-slide blood films. *Am. J. Med. Tech.* 46:624-632.
- Storie, I., A. Sawle, K. Goodfellow, L. Whitby, V. Granger, J. T. Reilly, and D. Barnett. 2003. Flow rate calibration I: a novel approach for performing absolute cell counts. *Cytometry B Clin Cytom* 55 (1):1-7.
- Storie, I., A. Sawle, L. Whitby, K. Goodfellow, V. Granger, J. T. Reilly, and D. Barnett. 2003. Flow rate calibration II: a clinical evaluation study using PanLeucoGating as a single-platform protocol. *Cytometry B Clin Cytom* 55 (1):8-13.
- Sturkie, P. D. 1986. *Avian physiology*. 4th ed. ed. New York: Springer.
- Sturkie, Paul David. 1965. *Avian physiology*. 2nd ed. ed. London: Ballie\0300re, Tindall and Cassell.
- Sung, Y. J., J. H. Hotchkiss, R. E. Austic, and R. R. Dietert. 1991. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J Leukoc Biol* 50 (1):49-56.
- Swaggerty, C. L., P. J. Ferro, I. Y. Pevzner, and M. H. Kogut. 2005. Heterophils are associated with resistance to systemic *Salmonella enteritidis* infections in genetically distinct chicken lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43 (2):149-54.
- Swaim, W. R. 1991. Laboratory and clinical evaluation of white blood cell differential counts. Comparison of the Coulter VCS, Technicon H-1, and 800-cell manual method. *Am J Clin Pathol* 95 (3):381-8.
- Swayne, D. E., S. L. Stockham, and G. S. Johnson. 1986. Cytochemical properties of chicken blood cells resembling both thrombocytes and lymphocytes. *Vet Clin Pathol* 15 (2):17-24.

- Tangredi, B. P. 1981. Heterophilia and left shift with fatal diseases in four psittacine birds. *J Zool Anim Med* 12:13-16.
- Theodorsen, L. 1995. Evaluation of monocyte counting with two automated instruments by the use of CD 14-specific immunomagnetic Dynabeads. *Clin Lab Haematol* 17 (3):225-9.
- Thrall, Mary Anna. 2004. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Baltimore, MD ; London: Lippincott Williams & Wilkins.
- Todd, J. C., A. H. Sanford, I. Davidsohn, and J. B. Henry. 1974. *Todd-Sanford clinical diagnosis by laboratory methods*. 15th ed. / edited by I. Davidsohn and J. B. Henry. ed. [S.l.]: Saunders.
- Topp, R. C., and H. C. Carlson. 1972. Studies on avian heterophils. 3. Phagocytic properties. *Avian Dis* 16 (2):374-80.
- Topp, R. C., and H. C. Carlson. 1972. Studies on avian heterophils. II. Histochemistry. *Avian Dis* 16 (2):369-73.
- Tvedten, H. W., and D. Korcal. 1996. Automated differential leukocyte count in horses, cattle, and cats using the Technicon H-1E hematology system. *Vet Clin Pathol* 25 (1):14-22.
- Uchiyama, R., T. Moritomo, O. Kai, K. Uwatoko, Y. Inoue, and T. Nakanishi. 2005. Counting absolute number of lymphocytes in quail whole blood by flow cytometry. *J Vet Med Sci* 67 (4):441-4.
- Uko, O. J., and A. M. Ataja. 1996. Effects of anticoagulants and storage (4 degrees C) on packed cell volume (PCV) of Nigerian domestic fowl (*Gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). *Br Poult Sci* 37 (5):997-1002.
- Vainio, O., B. Riwar, M. H. Brown, and O. Lassila. 1991. Characterization of the putative avian CD2 homologue. *J Immunol* 147 (5):1593-9.
- Veil, K. 1978. Feststellung von Blutwerten bei verschiedenen Vogelarten., Vet.-med. Diss. , München.
- Viertlboeck, B. C., and T. W. Gobel. 2007. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Vet Immunol Immunopathol*.

- Viertlboeck, B. C., A. Wortmann, R. Schmitt, J. Plachy, and T. W. Gobel. 2008. Chicken C-type lectin-like receptor B-NK, expressed on NK and T cell subsets, binds to a ligand on activated splenocytes. *Mol Immunol* 45 (5):1398-404.
- Vives Corrons, J.L. , I. Besson, N. Villamor, M. Aymerich, J.L. Marín, and J.M. Jou. Evaluation of the reproducibility of automated monocyte counting using flow cytometry and monoclonal antibodies. *Sangre (Barc)* 39 (3):197-201.
- Voigt, Gregg L. 2000. *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians*. 1st ed. ed. Ames: Iowa State University Press.
- Walker, C. L., L. Whitby, V. Granger, I. Storie, J. T. Reilly, and D. Barnett. 2006. Flow rate calibration. III. The use of stabilized biostandards to calibrate the flow rate and calculate absolute CD4+ T-cell counts. *Cytometry B Clin Cytom* 70 (3):154-62.
- Wang, W., R. F. Wideman, Jr., M. E. Chapman, T. K. Bersi, and G. F. Erf. 2003. Effect of intravenous endotoxin on blood cell profiles of broilers housed in cages and floor litter environments. *Poult Sci* 82 (12):1886-97.
- Wardlaw, S. C., and R. A. Levine. 1983. Quantitative buffy coat analysis. A new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. *Jama* 249 (5):617-20.
- Weiser, M.G. 1987. Modification and evaluation of a multichannel blood cell counting sytem for blood analysis in veterinary hematology. *J Am Vet Med Assoc* 190:411-415.
- Weiss, D. J. 1984. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol* 13 (2):27-31.
- Welty, Joel Carl. 1975. *The life of birds*. 2d ed. ed. Philadelphia: Saunders.
- Wenk, R. E. 1976. Comparison of five methods for preparing blood smears. *Am J Med Technol* 42 (3):71-8.
- Wernery, Ulrich, Murray E. Fowler, and Renate Wernery. 1999. *Color atlas of camelid hematology*. Berlin <etc.>: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Westgard, J. O., and M. R. Hunt. 1973. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin Chem* 19 (1):49-57.

Literaturverzeichnis

- Westgard, James O., Elsa F. Quam, Patricia L. Barry, and Sharon Sabatke Ehrmeyer. 2003. *Basic method validation*. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC.
- Wight, P. A., W. A. Dewar, and G. M. Mackenzie. 1980. Monocytosis in experimental zinc deficiency of domestic birds. *Avian Pathol.* 9:61-66.
- Wintrobe, Maxwell Myer, and John P. Greer. 2004. Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. / edited by John P. Greer ... [et al.]. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins.
- Wirth, D. 1931. Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere: Urban & Schwarzenberg, Wien.
- Wirth, D. 1950. Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere: Urban & Schwarzenberg, Wien.
- Wiseman, B. K. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 28:1030. 1931. An Improved Method for Obtaining White Cell Counts in Avian Blood. Paper read at Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
- Wunder, E., H. Sovalat, G. Fritsch, F. Silvestri, P. Henon, and S. Serke. 1992. Report on the European Workshop on Peripheral Blood Stem Cell Determination and Standardization--Mulhouse, France, February 6-8 and 14-15, 1992. *J Hematother* 1 (2):131-42.
- Young, J. R., T. F. Davison, C. A. Tregaskes, M. C. Rennie, and O. Vainio. 1994. Monomeric homologue of mammalian CD28 is expressed on chicken T cells. *J Immunol* 152 (8):3848-51.
- Zerbe, H., H. J. Schuberth, F. Engelke, J. Frank, E. Klug, and W. Leibold. 2003. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* 60 (2):209-23.
- Zinkl, J. G. 1986. Avian Hematology. Edited by O. W. Schalm and N. C. Jain. 4th ed, Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger.

10 Anhang

Mikroskopie - Cytometrie unfixiert						
	Thrombozyten:	Leukozyten	Lymphozyten	Monozyten	Heterophile	Basophile
Z	-2,803(a)	-1,376(a)	-1,682(a)	-,764(a)	-1,274(a)	-2,803(b)
P	0.005	0.169	0.093	0.445	0.203	0.005

Mikroskopie - Cytometrie fixiert T3						
	Thrombozyten:	Leukozyten	Lymphozyten	Monozyten	Heterophile	Basophile
Z	-2,599(a)	-1,376(a)	-,968(a)	-,561(a)	-,764(a)	-2,090(b)
P	0.009	0.169	0.333	0.575	0.445	0.037

Cytometrie fixiert T3 - Cytometrie unfixiert								
	Thrombozyten	Leukozyten	Lymphozyten	T-Lymphozyten	B-Lymphozyten	Monozyten	Heterophile	Basophile
Z	-,255(a)	-1,478(b)	-2,803(b)	-2,599(b)	-2,293(b)	-1,580(b)	-1,580(b)	-2,803(a)
P	0.799	0.139	0.005	0.009	0.022	0.114	0.114	0.005

Cytometrie fixiert T0 - Cytometrie unfixiert								
	Thrombozyten	Leukozyten	Lymphozyten	T-Lymphozyten	B-Lymphozyten	Monozyten	Heterophile	Basophile
Z	-2,701(a)	-2,803(a)	-2,599(a)	-2,599(a)	-2,497(a)	-2,803(a)	-1,580(a)	-2,395(b)
P	0.007	0.005	0.009	0.009	0.013	0.005	0.114	0.017

Cytometrie fixiert T3 - Cytometrie fixiert T0								
	Thrombozyten	Leukozyten	Lymphozyten	T-Lymphozyten	B-Lymphozyten	Monozyten	Heterophile	Basophile
Z	-1,274(a)	-,764(a)	-,866(b)	-,968(b)	-,255(b)	-1,988(a)	-,866(b)	-2,599(a)
P	0.203	0.445	0.386	0.333	0.799	0.047	0.386	0.009

Tab. 13:

Wilcoxon-Test: Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie

a: Basiert auf negativen Rängen. b: Basiert auf positiven Rängen.

P: Asymptotische Signifikanz (2-seitig);

absolute Differenzen: Cytometrie unfixiert - Mikroskopie					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-10.528	8.480	-9.867	-27.492	-1.137
Leukozyten	-3.468	6.166	-2.436	-11.717	4.719
Lymphozyten	-2.289	3.818	-2.647	-8.196	3.527
Monozyten	-672	1.555	6	-3.730	1.130
Heterophile	-536	1.224	-590	-2.802	1.026
Basophile	1.331	1.391	954	98	4.979

absolute Differenzen: Cytometrie fixiert T3 - Mikroskopie					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-11.338	7.926	-12.678	-21.731	1.691
Leukozyten	-2.057	5.191	-2.273	-8.325	6.011
Lymphozyten	-962	3.483	-1.086	-6.325	5.127
Monozyten	-468	1.377	71	-3.468	924
Heterophile	-256	1.173	-421	-2.293	1.589
Basophile	474	671	272	-487	1.783

absolute Differenzen: Cytometrie fixiert T3 - Cytometrie unfixiert					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-810	6.477	762	-10.845	5.761
Leukozyten	1.410	2.728	2.498	-4.683	4.012
Lymphozyten	1.327	937	1.470	105	2.825
T-Lymphozyten	1.014	781	1.099	-233	1.864
B-Lymphozyten	319	394	179	-161	972
Monozyten	205	353	206	-229	858
Heterophile	280	500	444	-656	855
Basophile	-858	1.376	-544	-4.671	-32

absolute Differenzen: Cytometrie unfixiert - Mittelwert Cytometrie unfixiert / fixiert T0 / fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-714	2.156	-1.242	-3.169	3.633
Leukozyten	-1.135	1.252	-1.436	-2.389	1.235
Lymphozyten	-793	417	-786	-1.512	-145
T-Lymphozyten	-587	355	-607	-1.133	-20
B-Lymphozyten	-209	206	-146	-555	36
Monozyten	-232	148	-244	-426	6
Heterophile	-144	220	-130	-415	252
Basophile	421	717	267	-36	2.417

Tab. 14:
Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie: absolute Differenzen

absolute Differenzen: Cytometrie fixiert T0 - Mittelwert Cytometrie unfixiert / fixiert T0 / fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	2.237	2.565	1.723	-444	7.816
Leukozyten	859	944	877	-639	2.358
Lymphozyten	259	593	192	-708	1.364
T-Lymphozyten	160	480	96	-540	1.003
B-Lymphozyten	98	156	111	-167	361
Monozyten	260	173	239	-6	538
Heterophile	8	169	-8	-254	268
Basophile	15	94	28	-164	149

absolute Differenzen: Cytometrie fixiert T3 - Mittelwert Cytometrie unfixiert / fixiert T0 / fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-1.523	4.429	-480	-9.304	2.770
Leukozyten	276	1.612	546	-3.448	2.108
Lymphozyten	534	664	529	-561	1.313
T-Lymphozyten	427	543	451	-465	1.160
B-Lymphozyten	111	218	81	-226	416
Monozyten	-28	235	-46	-337	432
Heterophile	136	302	202	-404	475
Basophile	-437	661	-277	-2.253	21

absolute Differenzen: Cytometrie fixiert T0 - Cytometrie unfixiert					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	2.950	1.684	2.915	-54	6.327
Leukozyten	1.993	1.523	1.681	329	4.747
Lymphozyten	1.052	780	1.056	-126	2.166
T-Lymphozyten	747	647	678	-165	1.722
B-Lymphozyten	307	292	320	-203	695
Monozyten	492	220	521	187	881
Heterophile	152	250	59	-126	683
Basophile	-406	781	-230	-2.581	184

absolute Differenzen: Cytometrie fixiert T0 - Cytometrie fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	3.760	6.910	2.203	-3.214	17.120
Leukozyten	583	2.326	165	-2.311	5.660
Lymphozyten	-275	1.188	-411	-1.997	1.925
T-Lymphozyten	-268	962	-368	-1.700	1.468
B-Lymphozyten	-12	319	-91	-308	518
Monozyten	287	385	332	-438	836
Heterophile	-128	437	-198	-635	555
Basophile	452	613	325	-95	2.090

Tab. 15:
Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und
Mikroskopie: absolute Differenzen

relative Differenzen: Cytometrie unfixiert - Mikroskopie					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-15.49	11.59	-15.07	-36.53	-1.69
Leukozyten	-8.17	15.54	-8.28	-27.90	13.48
Lymphozyten	-7.84	16.89	-12.90	-29.19	21.46
Monozyten	-4.66	25.40	0.89	-37.17	36.18
Heterophile	-8.09	25.39	-19.63	-35.44	30.50
Basophile	82.05	66.56	68.67	2.92	178.70

relative Differenzen: Cytometrie fixiert T3 - Mikroskopie					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-16.55	11.46	-20.21	-29.17	2.99
Leukozyten	-4.21	14.40	-7.51	-19.02	22.90
Lymphozyten	-1.90	16.67	-4.61	-22.53	31.20
Monozyten	-2.19	20.48	0.21	-28.51	29.58
Heterophile	-0.05	33.05	-9.47	-30.56	79.11
Basophile	36.00	50.30	24.95	-14.49	156.20

relative Differenzen: Cytometrie fixiert T3 - Cytometrie unfixiert					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-0.62	10.83	1.42	-16.60	12.06
Leukozyten	4.98	8.47	6.97	-11.79	16.65
Lymphozyten	6.79	5.08	6.86	0.52	14.51
T-Lymphozyten	5.71	4.48	6.41	-1.30	10.19
B-Lymphozyten	18.68	28.37	7.87	-6.36	87.08
Monozyten	4.29	9.53	3.03	-7.73	21.15
Heterophile	8.88	15.77	7.80	-14.54	37.24
Basophile	-21.66	20.28	-15.73	-59.77	-1.35

relative Differenzen: Cytometrie unfixiert - Mittelwert Cytometrie unfixiert / fixiert T0 / fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-1.43	3.69	-2.30	-6.22	5.83
Leukozyten	-3.46	3.71	-4.18	-7.32	3.21
Lymphozyten	-3.81	2.04	-3.62	-6.90	-0.72
T-Lymphozyten	-3.15	1.86	-3.36	-5.84	-0.11
B-Lymphozyten	-9.13	10.57	-6.63	-32.76	2.05
Monozyten	-4.56	3.68	-3.87	-11.56	0.15
Heterophile	-3.75	5.81	-3.58	-14.18	5.93
Basophile	13.20	14.52	8.36	-0.90	44.79

Tab. 16:
Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie: relative Differenzen

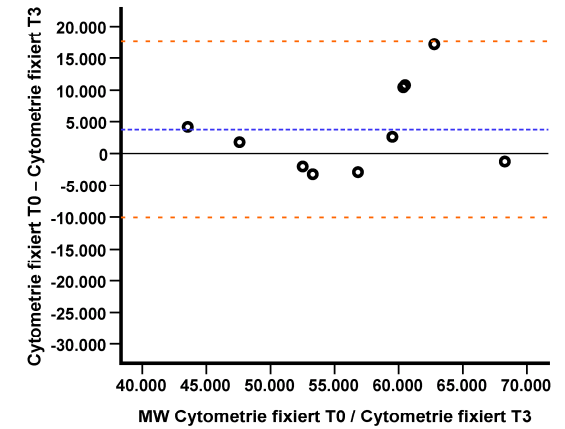
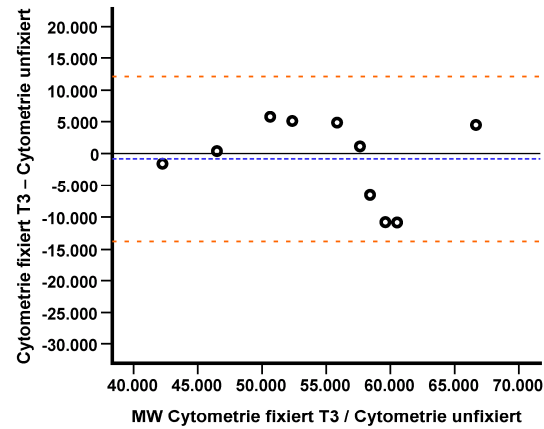
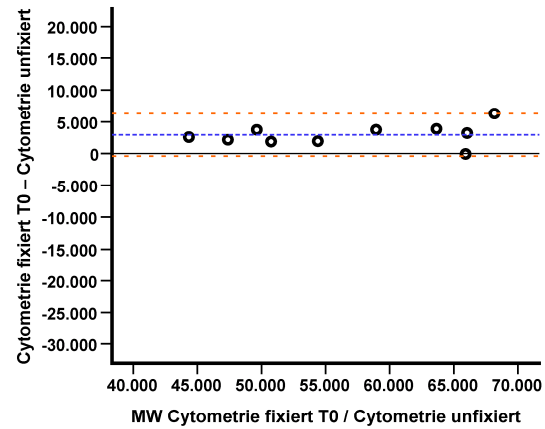
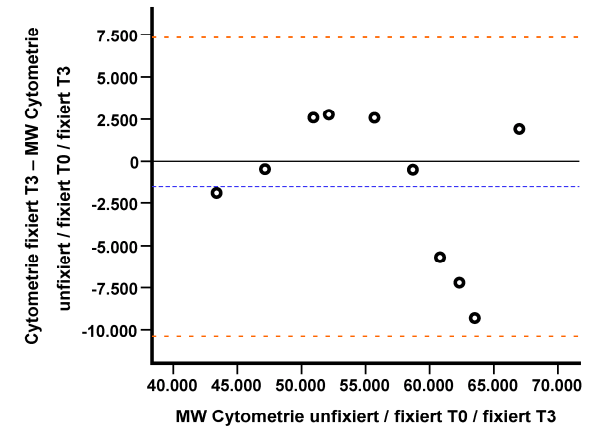
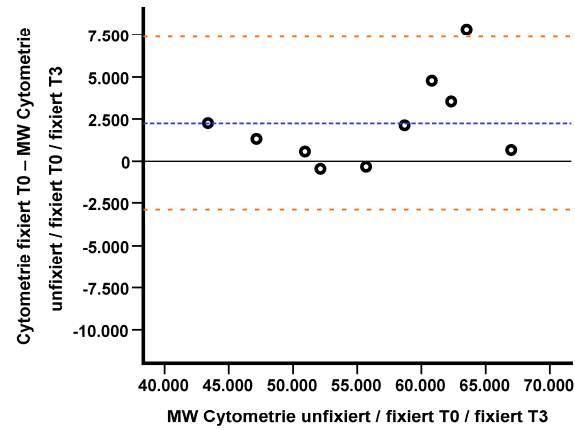
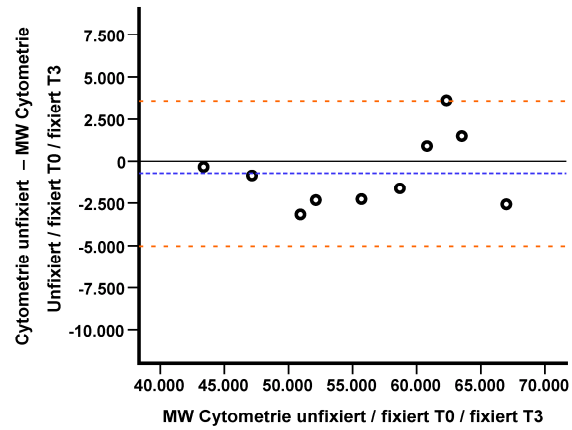
relative Differenzen: Cytometrie fixiert T0 - Mittelwert Cytometrie unfixiert / fixiert T0 / fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	3.83	4.10	3.21	-0.85	12.30
Leukozyten	2.38	2.48	2.57	-1.83	5.84
Lymphozyten	1.17	2.87	0.87	-3.46	6.67
T-Lymphozyten	0.82	2.65	0.48	-2.89	5.73
B-Lymphozyten	3.88	6.61	5.52	-9.41	12.30
Monozyten	5.31	3.80	5.45	-0.13	11.35
Heterophile	-0.24	4.16	0.06	-6.60	5.56
Basophile	0.73	2.64	1.24	-3.22	4.17

relative Differenzen: Cytometrie fixiert T3 - Mittelwert Cytometrie unfixiert / fixiert T0 / fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	-2.39	7.33	-0.92	-14.65	5.31
Leukozyten	1.08	4.78	1.46	-8.96	8.11
Lymphozyten	2.64	3.35	2.33	-2.75	7.43
T-Lymphozyten	2.32	3.03	2.39	-2.66	6.21
B-Lymphozyten	5.26	10.36	4.43	-8.73	25.80
Monozyten	-0.75	5.65	-1.03	-8.13	9.64
Heterophile	3.99	9.02	3.79	-9.48	17.78
Basophile	-13.93	14.09	-8.69	-41.75	0.92

relative Differenzen: Cytometrie fixiert T0 - Cytometrie unfixiert					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	5.36	2.66	5.52	-0.08	9.73
Leukozyten	6.18	4.47	5.90	0.97	12.49
Lymphozyten	5.23	3.87	5.49	-0.64	11.03
T-Lymphozyten	4.14	3.59	3.63	-0.91	9.42
B-Lymphozyten	16.25	19.42	13.94	-11.23	59.07
Monozyten	10.47	5.49	9.69	4.40	20.25
Heterophile	3.85	5.01	2.23	-2.24	12.34
Basophile	-9.78	10.96	-6.51	-33.03	4.69

relative Differenzen: Cytometrie fixiert T0 - Cytometrie fixiert T3					
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
Thrombozyten	7.22	12.62	4.16	-5.85	31.58
Leukozyten	1.58	6.84	0.62	-8.22	16.16
Lymphozyten	-1.27	5.76	-1.86	-9.18	9.69
T-Lymphozyten	-1.33	5.28	-1.96	-8.56	8.62
B-Lymphozyten	-0.29	13.32	-1.17	-15.63	21.90
Monozyten	6.56	9.25	6.13	-8.91	20.62
Heterophile	-3.13	12.21	-4.21	-18.95	15.82
Basophile	20.33	22.52	10.13	-4.10	66.47

Tab. 17:
Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und
Mikroskopie: relative Differenzen



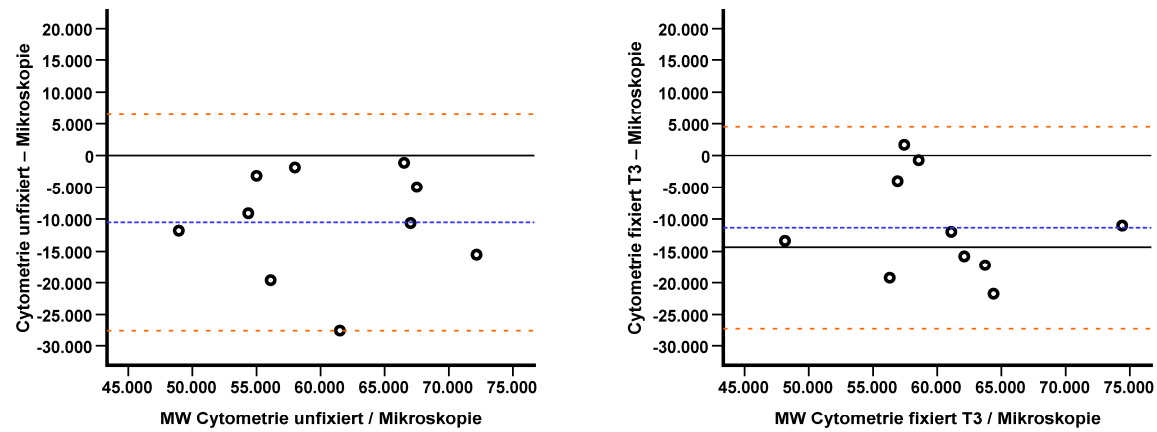
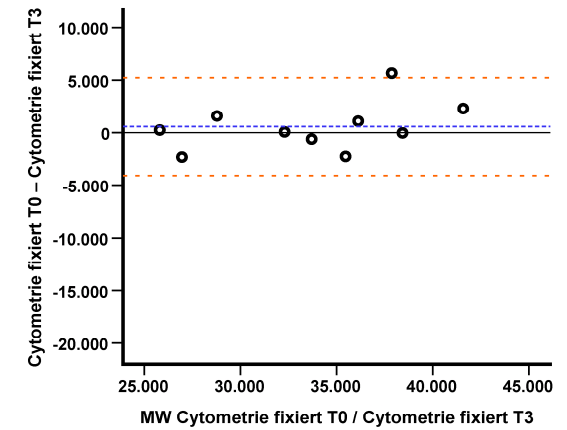
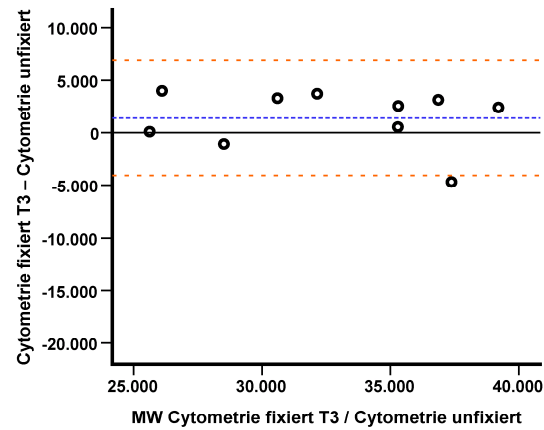
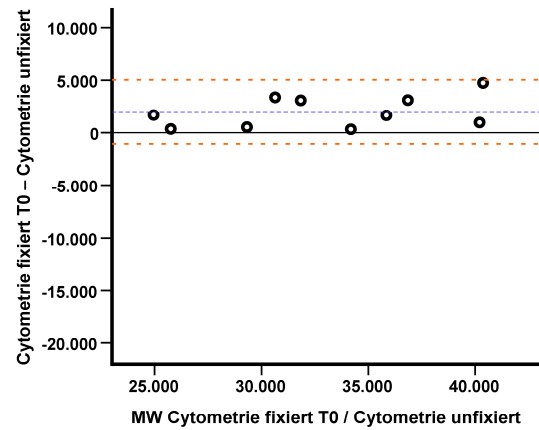
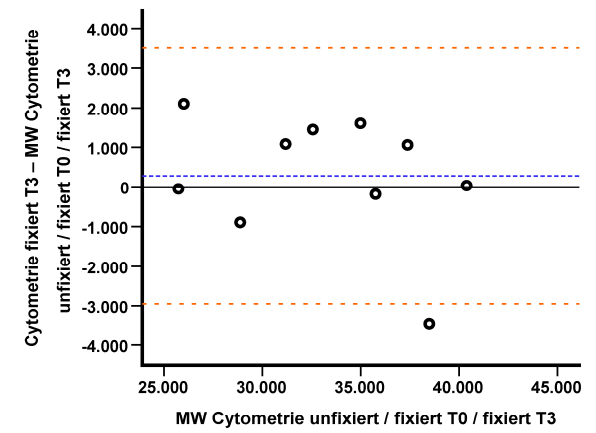
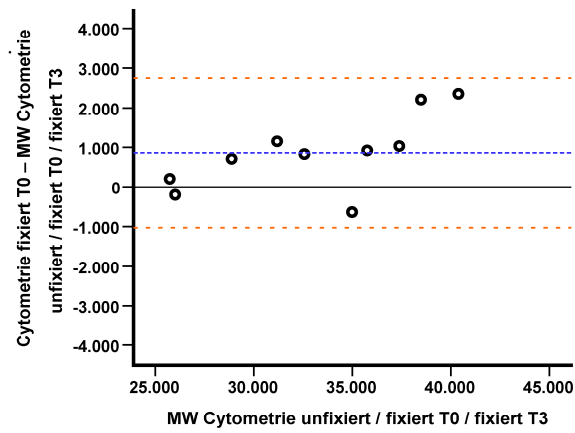
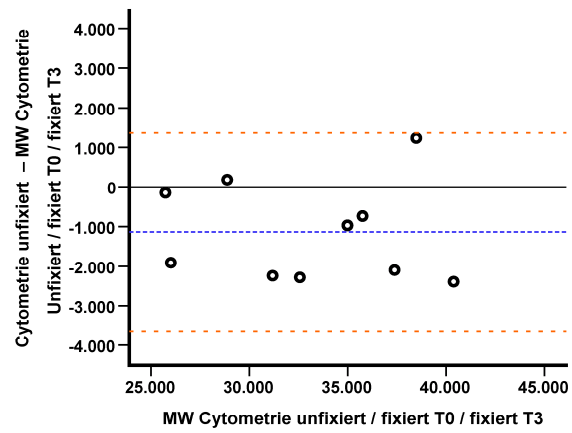


Abb. 53:
Thrombozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie mittels Bland-Altman-Plots



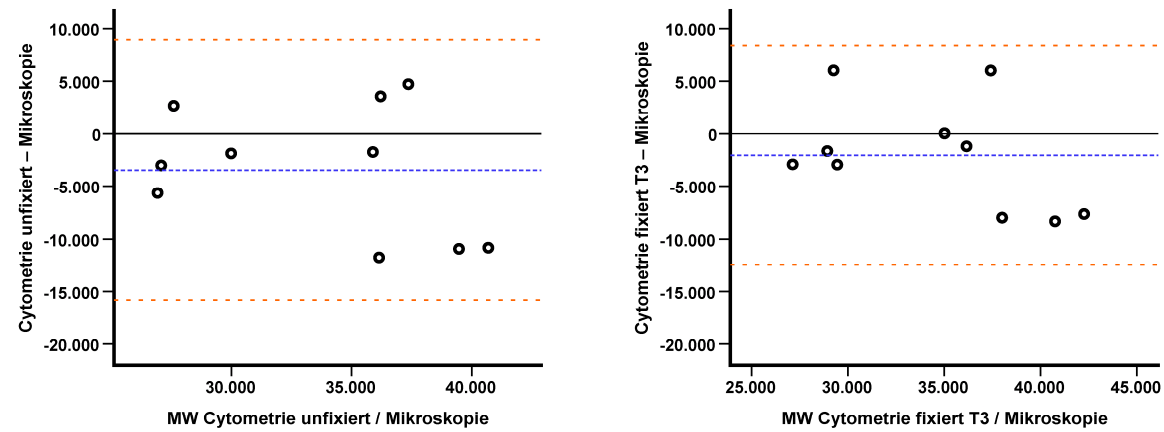
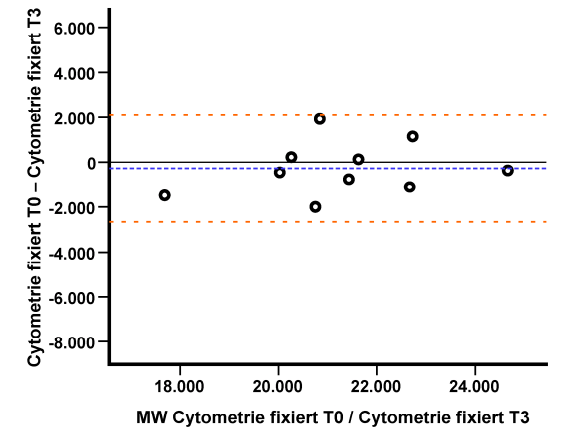
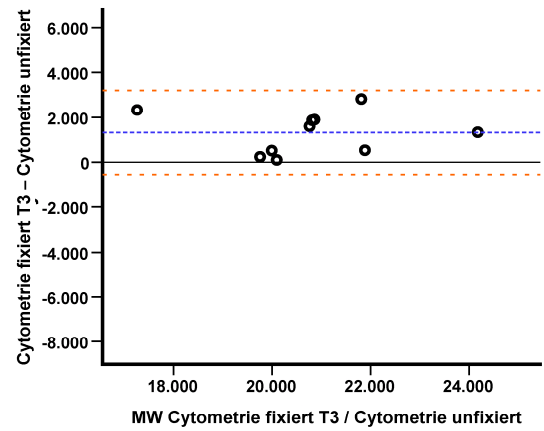
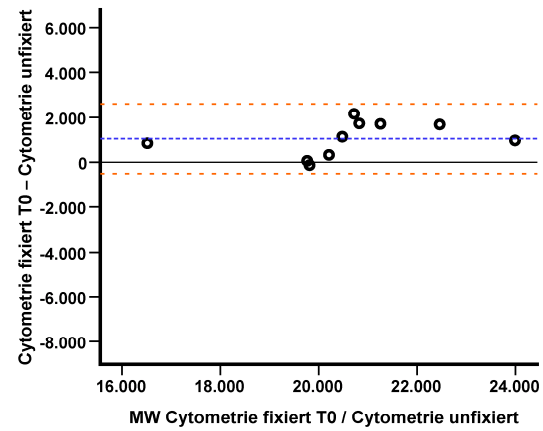
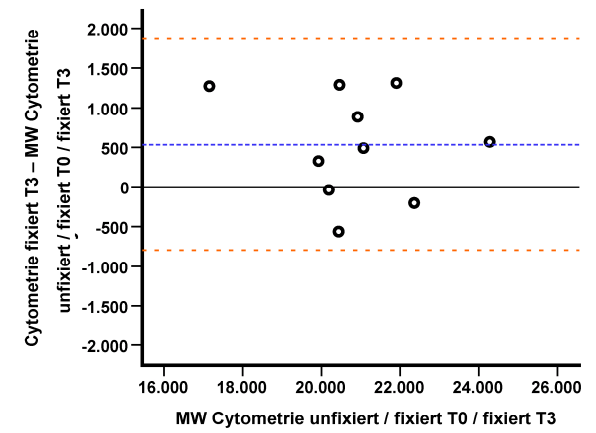
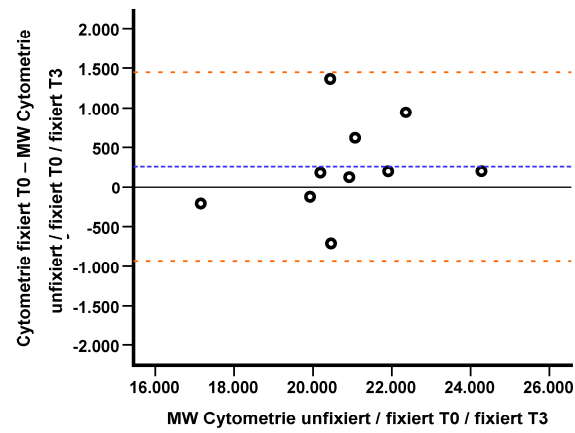
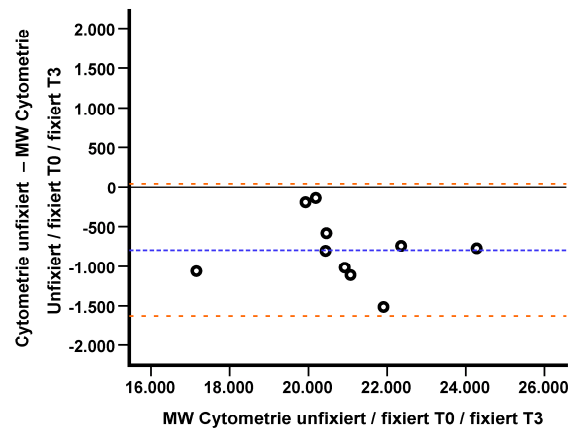


Abb. 54:
Leukozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie mittels Bland-Altman-Plots



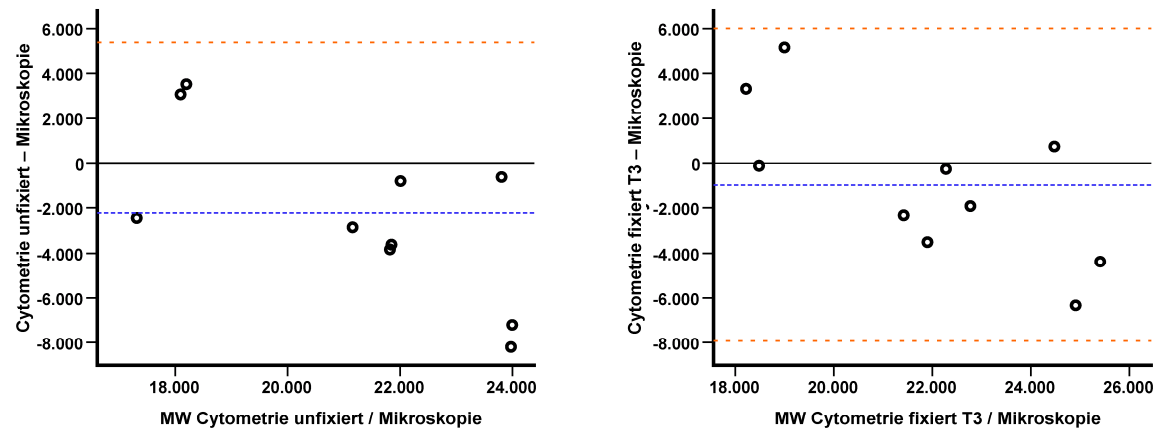
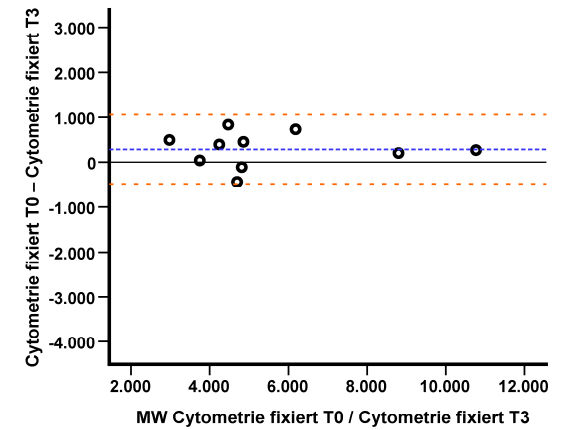
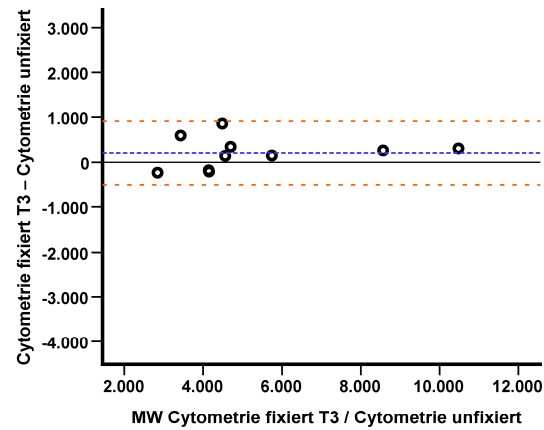
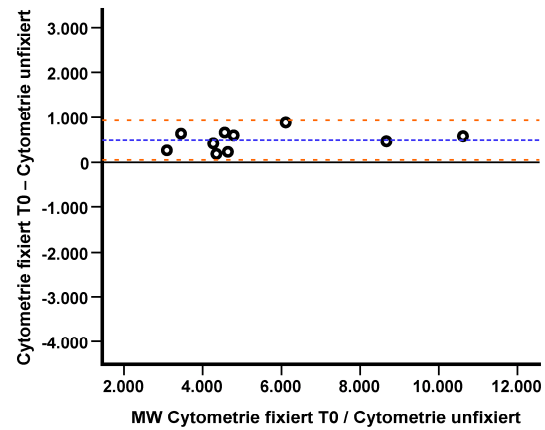
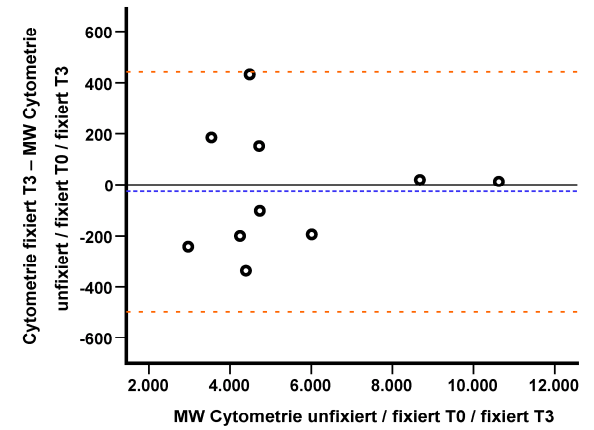
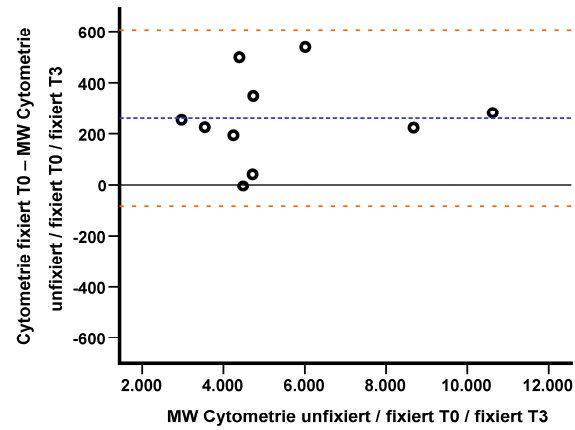
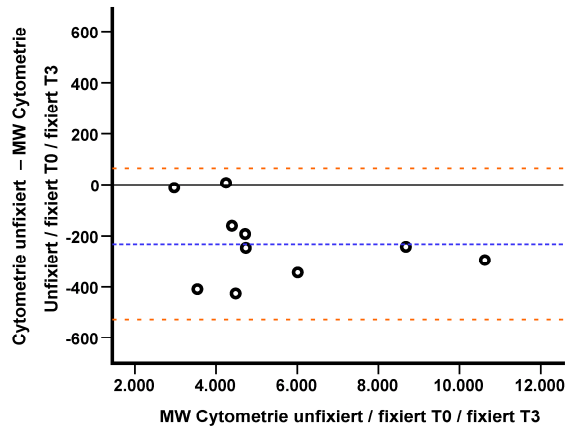


Abb. 55:
Lymphozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie mittels Bland-Altman-Plots



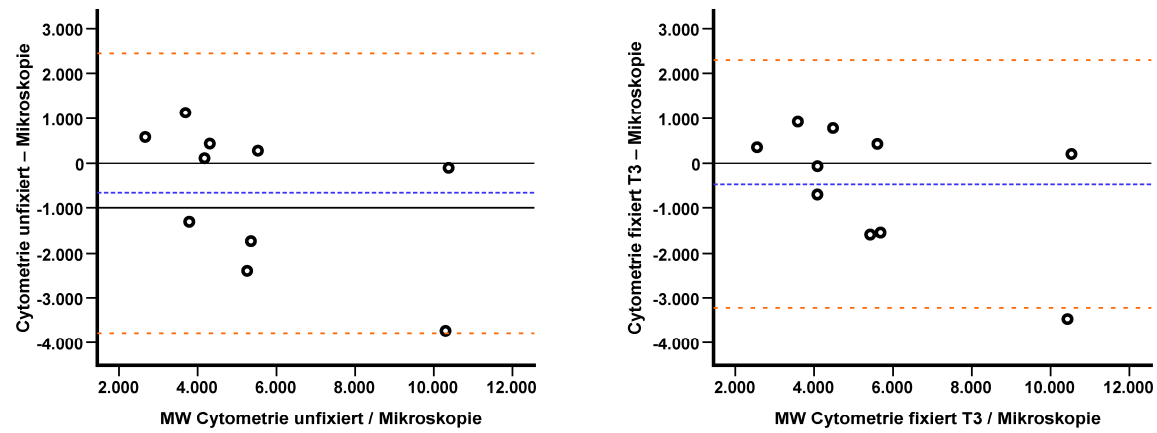
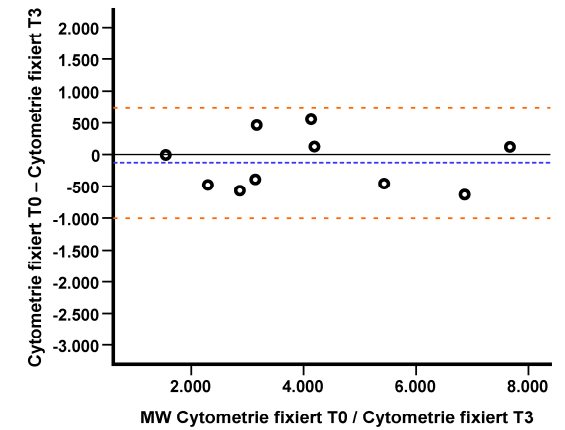
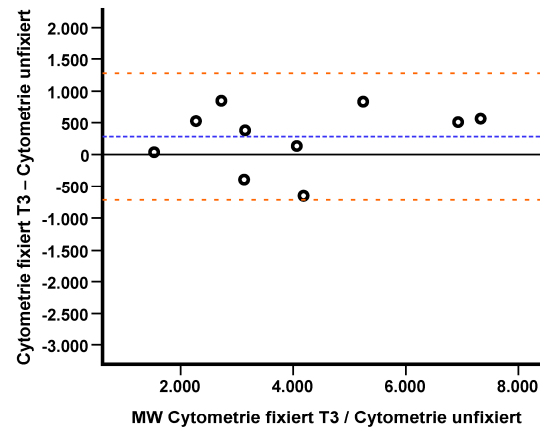
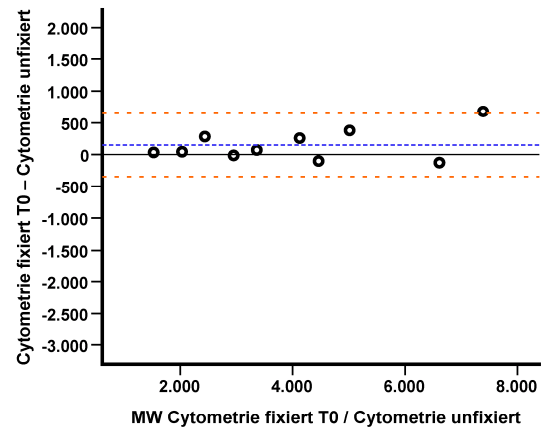
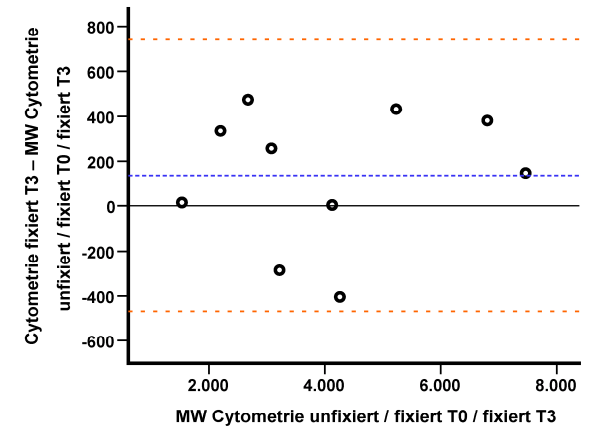
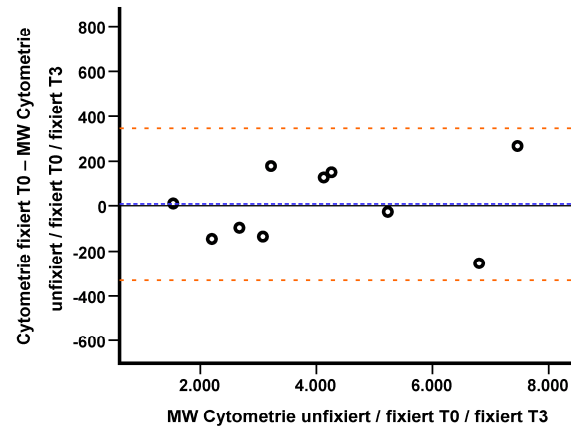
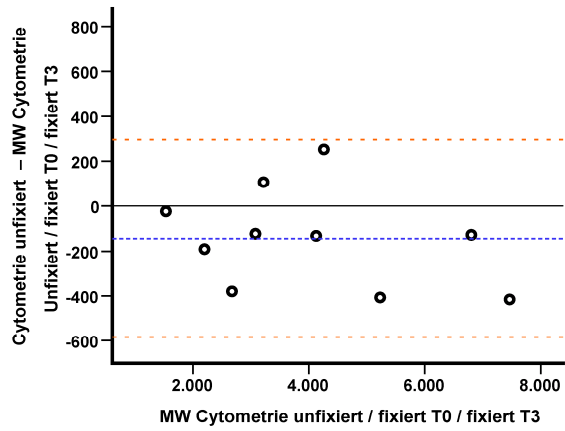


Abb. 56:
Monozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie mittels Bland-Altman-Plots



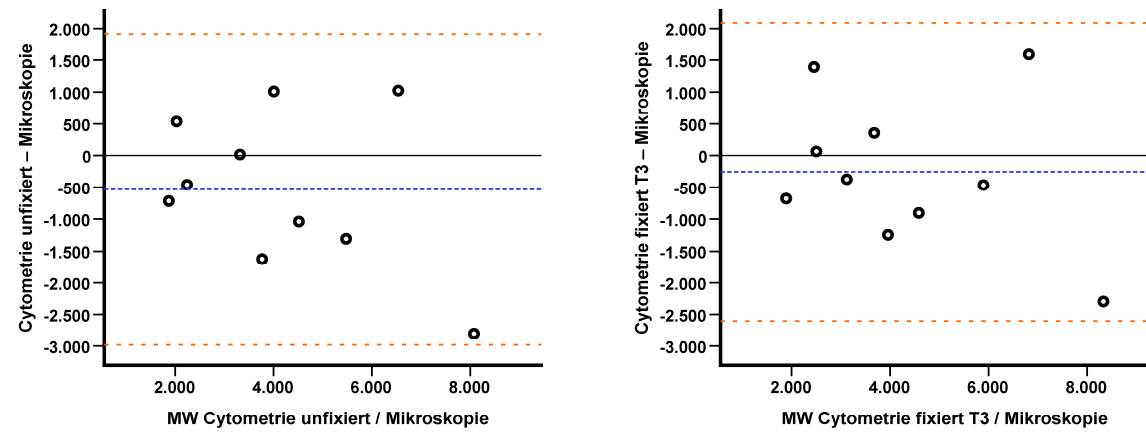
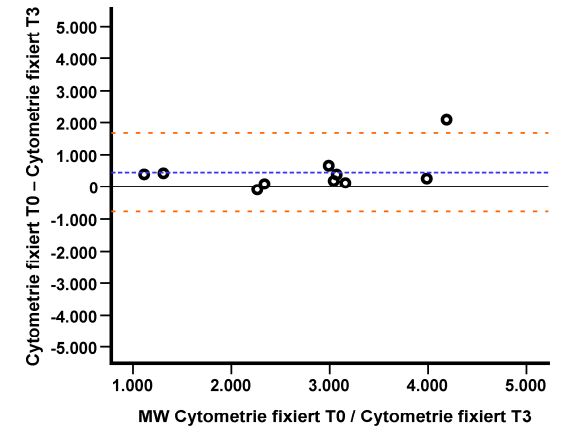
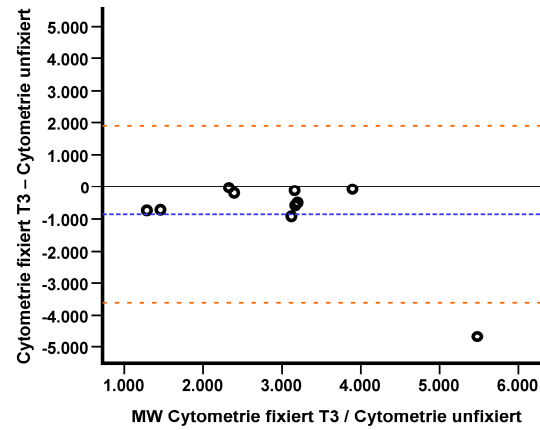
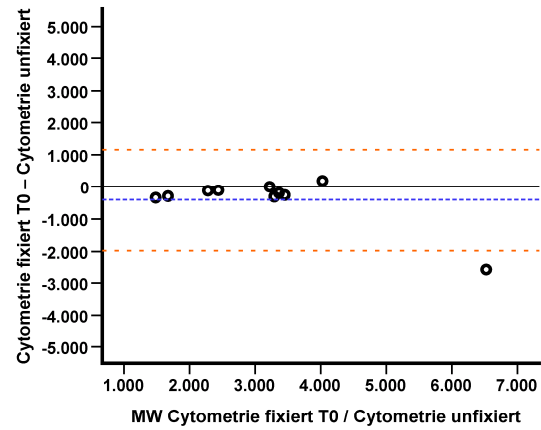
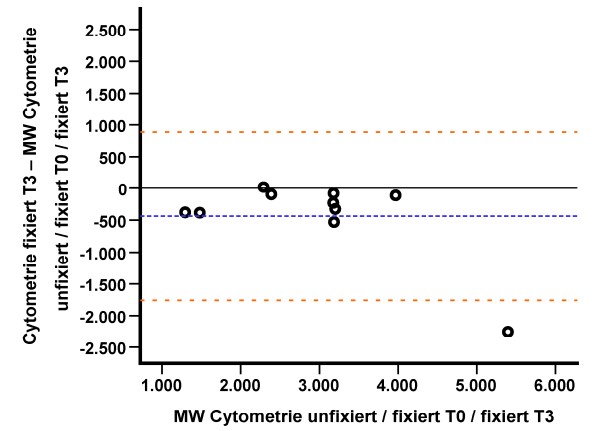
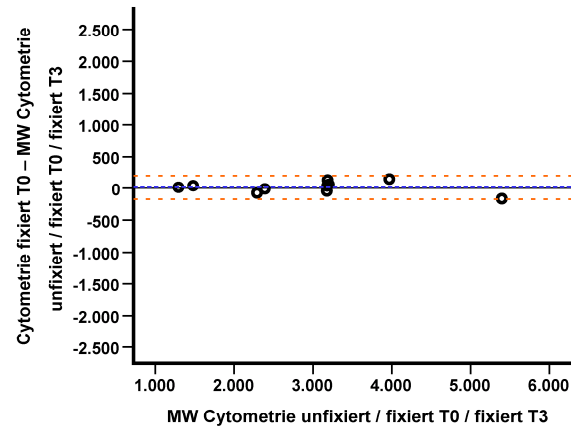
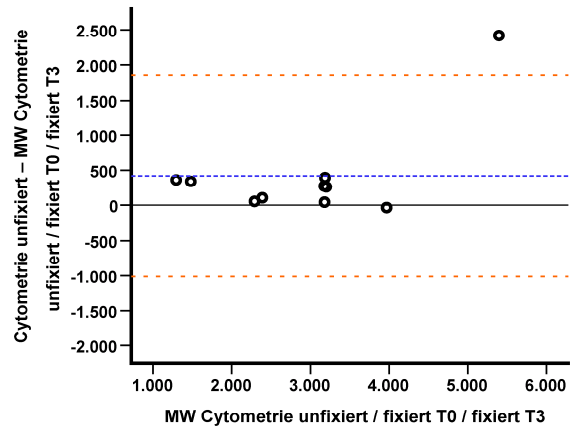


Abb. 57:
Heterophile Granulozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie mittels Bland-Altman-Plots



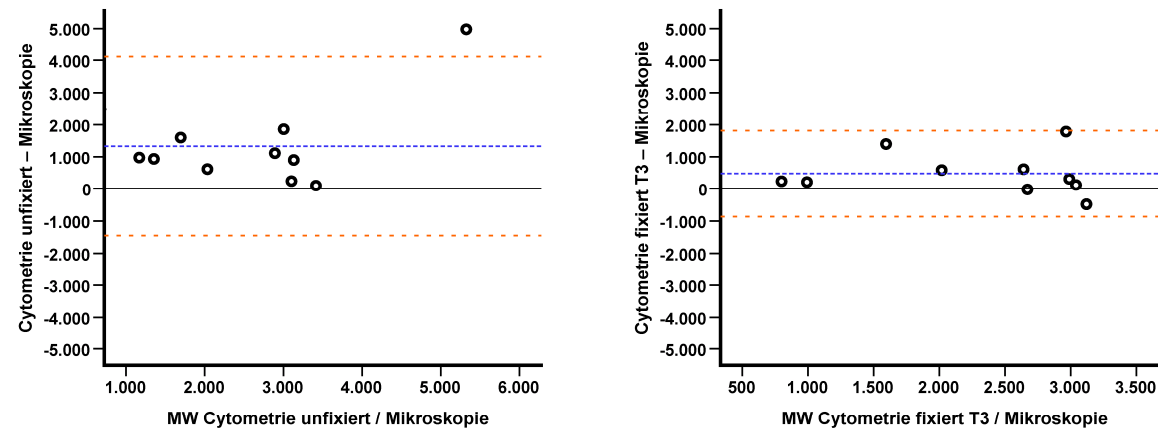


Abb. 58:
Basophile Granulozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) und Mikroskopie mittels Bland-Altman-Plots

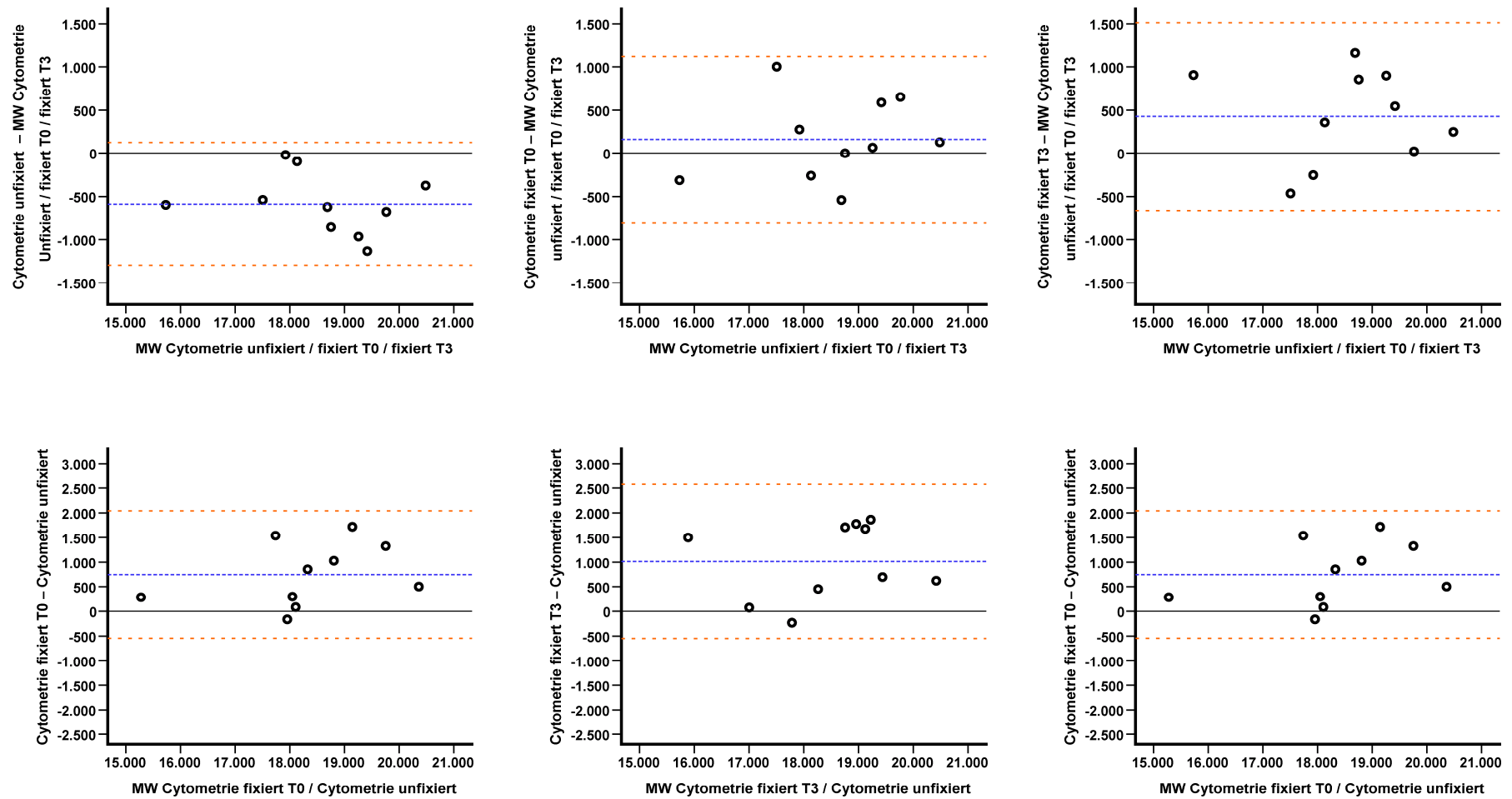


Abb. 59:
T-Lymphozyten:
Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) mittels Bland-Altman-Plots

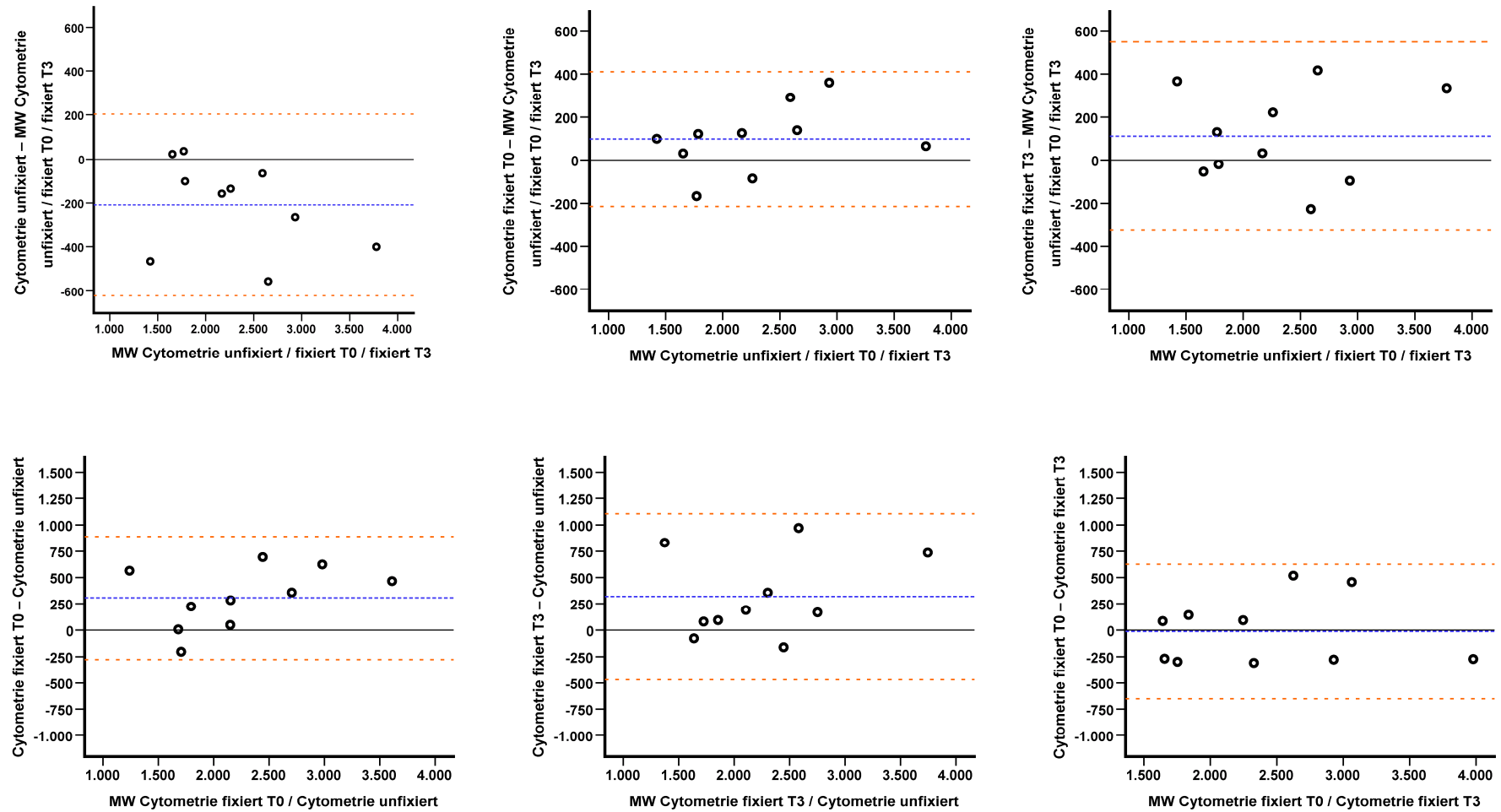


Abb. 60:

B-Lymphozyten:

Vergleich Durchflusszytometrische Messungen (unfixiert / fixiert Tag 0 / fixiert Tag 3) mittels Bland-Altman-Plot

Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Liste in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

- 1 AppliChem, Darmstadt
- 2 Amersham Biosciences, Freiburg
- 3 Beckman Coulter, Krefeld
- 4 Becton Dickinson, Heidelberg
- 5 Biochrom, Berlin
- 6 Bio-Rad, München
- 7 Braun, Melsungen
- 8 Eppendorf, Hamburg
- 9 Hecht, Sondheim
- 10 Invitrogen, Karlsruhe
- 11 Medion, Düringen
- 12 Menzl, Braunschweig
- 13 Merck, Darmstadt
- 14 Millipore, Schwalbach
- 15 Prozyme, San Leandro, California, USA
- 16 Ratiopharm, Ulm
- 17 Roth, Karlsruhe
- 18 Sarstedt, Nümbrecht
- 19 Serotec AbD, MorphoSys Düsseldorf
- 20 Sigma, Deisenhofen
- 21 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA

Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Brutschrank	CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Durchflusszytometer	FACScan, FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Klein-Schüttler	Vortex-Genie	neoLab, Heidelberg
Mikroskop	Leica DMR	Leica, Bensheim
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz-Küvette	Sigma, Deisenhofen
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH, Hechingen
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Taumel-Rollenmischer	RM5	neoLab, Heidelberg
Ultraschallgerät	Sonoplus GM 200	Bandelin, Berlin
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

Tab. 18:

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Bernd Kaspers für seinen Rat und die fortwährende Unterstützung. Die Freiheit, die ich während meines Promotionsstudiums in seinem Labor genießen durfte, war sehr wichtig für mich.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Korbelt für die Tierärztliche Ausbildung an der Klinik für Vögel und dafür, dass er mein Interesse für die Vogelhämatologie geweckt hat.

Bei Herrn Prof. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, für seine Unterstützung und für sein Interesse an meiner Dissertation.

Dr. Sonja Kothlow danke ich herzlich dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. Swen Reese danke ich herzlich für die umfangreiche Unterstützung in Sachen Statistik.

Fritz Meggendorfer, Hedwiga Opitz und Thomas Hoschka danke ich für die Versorgung und Pflege der Hühner.

Steffi Rau danke ich für die Mithilfe bei durchflusszytometrischen Experimenten.

Dr. Heike Reball danke ich herzlich für meine vogelmedizinische Ausbildung und die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Dr. Helene Pendl danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung auf dem Gebiet der Mikroskopie.

Ramona Schmitt verdanke ich unter anderem Blutaussstriche von höchster Qualität.

Danksagung

Herrn Prof. Zerbe, Frau Mayerhofer, Dr. Frank Weber, und Frau Radloff danke ich für die Möglichkeit zur Benutzung des FACScan an der Klinik für Wiederkäuer.

Frau Mayer, Frau Hignet, Frau Crass und Frau Summer danke ich für die Unterstützung bei den Verwaltungsangelegenheiten.

Prof. Thomas Göbel und Prof. Cornelia Deeg und Dr. Birgit Viertböck danke ich für die Anregungen und Tips.

Herzlicher Dank gebührt allen meinen Mitdoktoranden/-innen:

Jenny Dieckmann, Yvonne Gräf, Iris Morgenroth, Katharina Schenk-Weibhauser, Stefan Härtle, Carsten Krohmann, Ute Breithaupt, Matthias Hanczaruk, Ferdinand Schmitt, Claudia Gick, Frank Altmann, Christina Buse und Benjamin Schusser.

Beatrice Schaerer und Ingrid Riehl danke ich für die großartige Unterstützung im Labor.

Dr. Susanne Schwarz und meinem Bruder Thomas Seliger danke ich für den EDV-support.

Ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern für Ihre fortwährende Unterstützung und dafür dass Sie mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich in aller Liebe meiner Freundin, für die Unterstützung, das Verständnis sowie für sehr viel Kraft die sie mir gegeben hat.